Über

Säureresistenz und Rassenbildung bei Aspergillus niger.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ekkehard Kadelbach

aus Ludwigsburg.

Mit 5 Textfiguren.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1931

Über

Säureresistenz und Rassenbildung bei Aspergillus niger.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Ekkehard Kadelbach

aus Ludwigsburg.

Mit 5 Textfiguren.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1931

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus den Jahrbüchern für wissensch. Botanik. Bd. 75. Heft 3.
Gebrüder Borntraeger, Leipzig

Einleitung.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nach der Säureresistenz des *Aspergillus niger* nachgegangen werden, insbesondere ob wirklich die Wasserstoffionenkonzentration der ausschlaggebende Faktor ist, oder ob noch andere Faktoren hinzukommen, ferner, ob eine Beziehung zwischen der Säureresistenz und der Stickstoffernährung des Pilzes zu finden sei. Als Material wurde der *Aspergillus*-Stamm des Botanischen Institutes in Tübingen verwendet, der seinerzeit von Schober isoliert worden war und in dieser Arbeit als *Aspergillus niger* Tübingen bezeichnet wird. Bei der Wiederholung der Schoberschen Normalversuche wurden so auffällige Unterschiede gegenüber dessen Ergebnissen gefunden, daß hier ganz offensichtlich wieder einmal eine Änderung physiologischer Eigenschaften infolge langer Kultur vorgelegen hat, wie sie anderweitig schon von zahlreichen Autoren beschrieben worden ist. Nach allem, was darüber bekannt ist, sind kaum jemals zwei völlig gleichartige *Aspergillus*-Rassen aus der Natur isoliert worden, und anscheinend ist es auch noch nie gelungen, die Eigenschaften (die morphologischen wie besonders die physiologischen) längere Zeit hindurch bei Kultur im Laboratorium zu erhalten. Die Ursache dieses labilen Verhaltens der Pilzstämme ist noch völlig unbekannt, und die Lösung des Problems nur möglich durch breite Kenntnis der einzelnen Faktoren, die für eine solche Änderung überhaupt in Frage kommen.

So ist also im Anschluß an die oben angeführten Untersuchungen auch ein Beitrag zu dem eben genannten Problem ge-

geben worden, wodurch sich die Arbeit in zwei Hauptabschnitte gliedert, von denen der erste die Säureresistenz behandelt, der zweite den Faktoren der Veränderung nachgeht.

Diese Arbeit wurde im Botanischen Institut der Technischen Hochschule zu Darmstadt im Wintersemester 1928/29 begonnen und im Dezember 1930 beendet. Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. Fr. Oehlkers danke ich herzlich für sein stets vorhandenes Interesse, für die weitgehende Förderung der Arbeit und für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut. Herrn Professor Dr. E. Lehmann, Tübingen, sage ich meinen verbindlichsten Dank für die Übernahme des Referates meiner Arbeit.

Abschnitt I.

Material.

Als Material für die folgenden Arbeiten dienten die nachstehend angeführten *Aspergillus*-Rassen: *Aspergillus niger* var. *altipes*, var. *Bassiae*, var. *cinnamomeus montanus*, var. *ficuus*, var. *fuscus montanus*, var. Göttingen, var. Tübingen Stamm 5 und Stamm 6.

Alle diese Rassen stammten aus der mykologischen Sammlung des Botanischen Instituts zu Darmstadt; sie wurden, seit Schober ihre physiologischen Eigenschaften bestimmt hatte, auf Malzagar gezogen (6% Biomalz, 3% Agar) bei etwa halbjährigem Überimpfen.

Diese verschiedenen Rassen wurden zur Prüfung ihrer physiologischen Eigenschaften zunächst auf einen stickstofffreien Nährboden aus Kieselgallerte[1]) überimpft, dem die üblichen Mineralsalze und Glukose zugesetzt worden waren; sie zeigten im Gegensatz zu Schobers (1930) Angaben nur ein äußerst spärliches Wachstum. Eine eingehende Wiederholung der Assimilationsversuche mit der von Schober verwendeten Apparatur und Methode zeigte, daß die Stämme das Vermögen Luftstickstoff zu binden, nahezu vollständig verloren hatten. Weiterhin stellte sich heraus, daß auch das Säurebildungsvermögen völlig verändert war; z. B. wurde Zitronensäure überhaupt nicht mehr gebildet, und auch in dem gegenseitigen quantitativen Verhältnis der anderen Säuren ergaben sich starke Abweichungen gegenüber dem von Schober

1) Nach Stahel (1911) hergestellt.

gefundenen Verhalten. So schien es gut, wenigstens von den am meisten verwendeten Formen neue Einsporkulturen anzulegen. Dazu wurde *Aspergillus cinnamomeus montanus*, *Aspergillus niger* Göttingen und *Aspergillus niger* Tübingen benutzt. Da ein Verfahren angewendet werden sollte, bei dem die Sporen durch mikroskopische Beobachtung auf ihre Isoliertheit kontrolliert werden können, ein Mikromanipulator jedoch — auch einer der zum Zweck der Sporenisolierung mehrfach beschriebenen einfachen — nicht zur Verfügung stand, so blieb nichts anderes übrig, als das von Lindner (1924) angegebene Verfahren der Tröpfchenkultur anzuwenden. Nach dieser Methode werden kleine Tropfen einer hinreichend verdünnten Sporensuspension auf sterilisierte Deckgläschen mittels Zeichenfedern aufgetragen, so daß man dann mit ebenfalls sterilisierten Fließpapierstreifchen diejenigen Tröpfchen absaugen und jeweils für sich in Kölbchen weiterwachsen lassen kann, die bei mikroskopischer Kontrolle nur eine Spore enthalten. So gut sich diese Methode zur Isolierung von Hefestämmen bewährt hat, weil man die Hefen schon im Tröpfchen zu Kolonien heranwachsen lassen kann, so wenig rationell erwies sie sich für die *Aspergilli;* nur in etwa 8—10 % derjenigen Kölbchen, in die auf diese Weise Sporen übertragen worden waren, wuchsen auch wirklich Myzelien heran. Verschiedene Variationen der Methode verbesserten das Ergebnis nicht. Da aber für unseren Fall die Ausbeute der ersten Versuche faktisch ausreichte, so wurde keine andere Methode mehr verwendet.

Wir erhielten auf diese Weise von *Aspergillus niger* Tübingen sechs, von *Aspergillus niger* Göttingen neun, von *Aspergillus cinnamomeus montanus* elf Einsporkulturen. Diese werden im Verlaufe der Arbeit als *Aspergillus niger* Tübingen Stamm 1 usw. bezeichnet. Der aus der Bakteriologie übernommene Ausdruck „Stamm" wurde gewählt, um damit anzudeuten, daß es sich hier jedesmal um eine besondere, aus einer Zelle hervorgegangene Entwicklungsreihe handelt, ohne daß aber vorerst irgend etwas über ihre innere Struktur ausgesagt wird. Während die Rassen *Aspergillus cinnamomeus montanus* und *Aspergillus niger* Göttingen in den einzelnen Stämmen keine äußeren Differenzen gegenüber der Ausgangsform aufwiesen, verhielt sich *Aspergillus niger* Tübingen wesentlich anders. Schon in den Kulturröhrchen, in denen der von Schober untersuchte *Aspergillus* Tübingen aufbewahrt und weiter gezüchtet worden war, hatte sich gezeigt, daß das ursprüng-

lich starke Sporulationsvermögen zurückgegangen war; nun stellte sich heraus, daß auch die einzelnen, daraus isolierten Stämme hinsichtlich der Stärke ihrer Sporenbildung auf Biomalzagar beträchtlich differierten. Stamm 1 und Stamm 6 zeigten schon kurze Zeit nach ihrer Überführung in die Agarröhrchen die typische, schwarzbraune Konidienbildung über die ganze Oberfläche, während die Stämme 2—5 eine mehr oder weniger schwache Sporenbildung an der oberen, dünnen Stelle des schräg ausgegossenen Agars aufwiesen. Diese Beobachtung war der Anlaß für die im zweiten Teil der Arbeit mitgeteilten Untersuchungen.

Abschnitt II.

Methoden.

1. Mykologische Methoden.

Alle Kulturgefäße, die für die im folgenden dargestellten Versuche verwendet wurden, bestanden aus Neutralglas. Für die Vorversuche und für die Versuchsreihen A und B dienten Erlenmeyerkolben von 500 ccm, für die Reihen C und D solche von 100 ccm Inhalt. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 100,0 Glukose, 1,0 KH_2PO_4, 0,2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 $FeCl_3$. Dazu kamen je nach dem Versuch verschiedene Stickstoffquellen, im wesentlichen Asparagin und KNO_3. Alle diese Substanzen wurden in redestilliertem Wasser zu 1000 ccm gelöst. Mehrfache Sterilisation erfolgte in strömendem Dampf. Alle zu den Versuchen verwendeten Chemikalien waren solche, die von der Firma E. Merck in Darmstadt unter der Bezeichnung „pro analysi" geliefert werden. Als Kohlenstoffquelle diente Glukose (Saccharum amylaceum pro infusione, Merck). Das redestillierte Wasser wurde durch Überdestillieren von Aqua destillata Merck nach der von Fitting (1928) angegebenen Methode gewonnen, nur wurde vor der Destillation etwas Kaliumpermanganat und Kalilauge zugefügt. — Geimpft wurde mit einer Sporensuspension derart, daß jede Kultur möglichst gleichmäßig etwa 2500—3000 Sporen enthielt. Zusatz von bestimmten Säuremengen unter sterilen Bedingungen, wie sie unsere Versuche erforderten, sowie das Halbieren von Myzelien erfolgte in einem Impfkasten, der für unsere Arbeit besonders zweckmäßig eingerichtet war, z. B. auch groß genug, um im Inneren eine Hand-

wage aufhängen zu können, auf der eine einigermaßen analytisch genaue Halbierung der Myzelien nachkontrolliert werden konnte.

2. Analytische Methoden.

Der p_H-Wert wurde mit Hilfe der Gaskette und zwar unter Verwendung der Kalomelwasserstoffelektrode ermittelt. Die im Elektrodengefäß verwendete Menge der Kulturflüssigkeit wurde nachher wieder der Kultur zugefügt, und diese hierauf durch Sterilisation in strömendem Dampf abgetötet. Als besonders geeignete Methode, die Myzelien von der Kulturflüssigkeit zu trennen, erwies sich die Verwendung von Büchner-Trichtern, die einem Glasrohr aufgesetzt wurden, das seinerseits durch ein seitliches Ansatzstück mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung stand. Die Filter mit den Myzelien wurden bei 90° getrocknet, und letztere später ohne Filter gewogen. Bei etwas vorsichtiger Handhabung vor dem Trocknen, Zusammenlegen mit der Pinzette oder Zusammenballen mit der Spritzflasche auf dem Filter, läßt sich das Myzel nach dem Trocknen leicht von dem Filter entfernen. Die Fehler sind dabei weitaus kleiner als bei Gegenwiegen des Filters. — Die titrimetrische Azidität wurde mit n/10 Alkali (Indikator Phenolphthaleïn) und Mikrobürette festgestellt. Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Gesamtnährlösung, also entweder auf 100 oder auf 20 ccm. — Zur Feststellung des Zuckerverbrauches wurde die Restsubstanz in der Nährlösung als reduzierender Zucker nach Bertrand bestimmt. Die Fehler dieser Methode halten sich innerhalb der Werte von 20—90 mg in erträglichen Grenzen; wir fanden $\pm$ 1 mg. Sind also in der Ausgangslösung andere Zuckermengen zu erwarten, so muß ihre Konzentration durch Verdünnung entsprechend geändert werden. Der Stickstoff der Myzelien wurde nach der Mikrokjeldahlmethode in der Weise, wie es Schober (1930) beschrieben hat, bestimmt, jedoch mit der Veränderung, daß das nach Bangs Vorschlag aus Silber bestehende Kühlrohr an dem von Parnas und Wagner (1921) angegebenen Destillationsapparat durch ein solches aus Hartglas ersetzt wurde (Suto, 1927).

Abschnitt III.

Die Säureresistenz von *Aspergillus niger*.

Während das Problem der Säurebildung bei *Aspergillus niger* in den letzten Jahren und Jahrzehnten weitgehendes Interesse gefunden hat, wurde die Frage nach der Säureresistenz und deren Bedingungen kaum aufgeworfen oder nur mehr oder weniger nebensächlich gestreift. Bevor auf die Untersuchungen eingegangen wird, die von uns selbst zur Klärung gerade dieser Fragen unternommen wurden, sei eine kurze Besprechung des in der Literatur bereits vorliegenden Materiales vorgenommen, wobei freilich nur diejenigen Arbeiten angeführt werden sollen, die sich unmittelbar auf unser Thema beziehen.

Von älteren Abhandlungen ist zunächst die von B. M. Duggar (1901) zu nennen; dieser Autor untersuchte die Keimung verschiedener Pilzsporen in einer Reihe von Nährmedien bei Zusatz von schädigenden Agenzien. Leider wurden viele seiner Versuche im hängenden Tropfen ausgeführt, so daß die Ergebnisse mit bedeutenden Fehlern behaftet sind. Duggar weist in seiner Arbeit S. 49/51 auch darauf hin, indem er mitteilt, daß die Sporen, die von der Oberfläche des Tropfens herunterfallen, im Verdunstungswasser zum Auskeimen gelangen. Eigene, im hängenden Tropfen ausgeführte Versuche gaben gleichfalls keine einwandfreien Resultate. Einmal wird stets eine Verdunstung des Tropfens eintreten, mit der eine Änderung der Konzentration der Nährlösung und der schädigenden Agenzien in unkontrollierbarem Maße Hand in Hand geht, andererseits läßt sich nie eine gleichmäßige Beimpfung derartiger Kulturen erzielen. Nikitinsky stellte dann (1904) direkt die schädigende Wirkung wechselnder Mengen von Oxalsäure fest, die er der Nährlösung zugesetzt hatte. Die von ihm gefundenen, schon bei geringen Säuremengen letal wirkenden Dosen dürften durch eine sekundäre Wirkung der Nährlösung zu erklären sein, da diese als Stickstoffquelle 1% NH_4NO_3 enthält. Erwähnt sei ferner die Arbeit Reichels (1910) an *Penicillium*. Verf. fand, daß die schädigende Wirkung der zugesetzten Essigsäure nicht durch deren Wasserstoffionen bedingt wird, da anorganische Säuren gleicher Wasserstoffionenkonzentration weit weniger schädigend wirkten. Hier wird also schon die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration angezweifelt, Vorstellungen, die mit denen neuerer Autoren

wie Traube (1921) und Kolthoff (1925) korrespondieren. Weiter gelangte Kiesel (1912); er stellte in seinen Reagensglaskulturen nicht nur wie sonst üblich die Keimung fest, sondern er verfolgte die Entwicklung auch noch weiterhin und beobachtete, bis zu welchen Säurekonzentrationen Myzeldecken auftraten und Sporulation erfolgte. Er bestreitet an Hand seines Materiales den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Sporenkeimung und Weiterentwicklung, während sein Vorgänger Duggar (1901) und auch noch ältere Autoren eine Abhängigkeit hatten feststellen wollen. Eine vollständige Entscheidung ist aus der Arbeit Kiesels jedoch noch nicht zu gewinnen; obwohl seine Methodik die seiner Vorgänger an Exaktheit übertrifft, ist sie jedoch insofern noch ungenau, als Kiesel zwar die Dissoziation der zugesetzten reinen Säure als bekannt voraussetzt, aber nicht in der Lage ist, die aktuelle Wasserstoffionenkonzentration in den Nährlösungen nach Zusatz der Säuren festzustellen. Rechnet man die in seiner Arbeit angegebenen Grammolekülmengen der zugegebenen Säuren auf die Gewichtszahlen um, so ergibt sich für Salzsäure 3,24 g, für Oxalsäure 15,0 g pro Liter als keimungshemmender Faktor. Die von uns später festgestellten Werte betrugen für Salzsäure 1,14 g, für Oxalsäure (wasserfrei) 12,2 g pro Liter. Solche Angaben sind aber, wie noch zu zeigen sein wird, ohne Kenntnis der Zusammensetzung der Nährlösung und anderer Kulturbedingungen nur schwer vergleichbar.

Die erste Arbeit, die unter Bestimmung der jeweiligen p_H ausgeführt wurde, stammt von Currie (1917). In seiner Tabelle III gibt dieser die Hemmungseffekte der Wasserstoffionenkonzentration bei *Aspergillus niger* an. Seine Nährlösung stimmte mit der unsrigen überein, abgesehen von der durch ihn gebotenen hohen Stickstoffmenge und der Verwendung von Saccharose. Seine Ergebnisse decken sich sehr gut mit den von uns bei Salz- und Oxalsäure gefundenen Werten, während Currie außerdem noch Zitronensäure benutzte. Da die Untersuchungen von Currie nur nebenbei in Verbindung mit Fragen über die Zitronensäurebildung ausgeführt wurden, fiel ein näheres Eingehen auf sich hieraus ergebende Fragen, wie Abhängigkeit des entstehenden Myzels, resp. seines Gewichtes von p_H und Stickstoffquelle u. a., weg, Untersuchungen, die im Verlauf der folgenden Arbeit unternommen wurden. Im Jahre 1921 veröffentlichte Webb in Fortsetzung seiner Forschungen (1919) eine Arbeit über die Sporenkeimung gewisser Pilze, darunter

auch *Aspergillus niger*, in Beziehung zur Wasserstoffionenkonzentration. Dabei wollte er feststellen, ob der Einfluß der p_H in verschiedenen Nährlösungen derselbe ist, ferner ob die Reihenfolge, in welcher die günstigste Keimung erfolgt, für verschiedene Nährlösungen dieselbe ist, und ob eine Beziehung zwischen der Ernährung und der Toxizität der Wasserstoff- und Hydroxylionen besteht. Verwendet wurden Wasser, Mannit- und Peptonlösung, außerdem Czapeks Nährlösung und Zuckerrübenabkochung, denen Säure oder Alkali zugefügt wurde. Die Ergebnisse wurden im hängenden Tropfen beobachtet und in Prozenten gekeimter Sporen angegeben. Dabei lieferte *Aspergillus niger* in Lösungen von Pepton und Mannit, sowie in Czapeks Nährlösung Kurven von guter Übereinstimmung. Seine beigegebene Tabelle II zeigt für *Aspergillus niger* Sporenkeimung erst bei p_H 2,1. Nur bei Verwendung von Zuckerrübenabkochung ergibt sich schon bei p_H 1,5 reichliche Auskeimung, ein Resultat, das wir mit unseren Stämmen auch bei Benutzung künstlicher Nährlösung erhielten. Diese abweichende Erscheinung dürfte weniger auf die Zusammensetzung der Nährlösung als vielmehr auf die verschiedene Resistenz der jeweils verwendeten *Aspergillus*-Stämme zurückzuführen sein. Der Autor weist am Schluß seiner Arbeit darauf hin, daß man nicht schlechtweg von einer p_H-Resistenz sprechen darf, sondern daß es nötig ist, die übrigen Kulturbedingungen jeweils mit anzugeben. Bernhauer (1929) zog zur Charakterisierung von *Aspergillus*-Stämmen saure Substrate heran und verwendete bei seinen Versuchen halbierte Myzeldecken; er fand, daß die einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber verschiedenen Säuren recht verschieden seien; auch waren bei verschiedenen Stickstoffquellen gewisse Unterschiede zu bemerken. Leider fehlt, bedingt durch die Eigenart der Versuchsanordnung, die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration, wodurch der Wert der Arbeit hätte gesteigert werden können. Interessant ist das bisweilige Auftreten von Myzelien, die sich durch stärkeres Wachstum oder erhöhte Säurebildung auszeichneten. Um was es sich hierbei, vererbungswissenschaftlich betrachtet, handelt, erörtert der Autor nicht.

1. Vorversuche.

Bevor größere Versuchsreihen angesetzt wurden, galt es Klarheit darüber zu gewinnen, welcher der sechs aus der ursprünglichen Tübinger Rasse neu isolierten *Aspergillus*-Stämme für unsere Frage-

stellung am geeignetsten ist. So wurden als Vorversuch alle sechs auf eine Nährlösung gebracht, die die üblichen Mineralsalze, ferner 5 % Glukose und als Stickstoffquelle 5 mg Stickstoff in Form von Ammontartrat in 100 ccm Wasser enthielt. Die Kulturen wurden in Parallelreihen angesetzt, der einen wurde jeweils 1,0 Kalziumkarbonat zugefügt. Die Dauer des Versuches betrug 16 Tage, die Temperatur war Zimmertemperatur zwischen 22° und 27° C. Diese Vorversuche zeigten, daß der Stamm 5 das höchste Myzelgewicht, die höchste Azidität und die geringste Wasserstoffionenkonzentration, übrigens auch als einziger der sechs Stämme Zitronensäure produzierte. Wir wählten also diesen Stamm und verwendeten später noch den Stamm 6 als zweiten.

Um für Stamm 5 die besten Vegetationsbedingungen und die extremsten Punkte der Stickstoffassimilation zu ermitteln, wurden sechs Reihen mit verschiedenen Stickstoffquellen angesetzt. Jede Reihe bestand aus sechs Versuchsgefäßen, die unter sich die gleiche Nährlösung enthielten und doppelt angesetzt wurden, da die Versuche sowohl bei 20° als auch 30° C liefen. Bei der vorhergehenden Versuchsreihe hatte sich gezeigt, daß bei den Kulturen mit Kalziumkarbonatzusatz ein starker Zuckerverbrauch vorhanden war. Die neuen Kulturen enthielten zwar kein Kalziumkarbonat, sollten dagegen aber zum Teil nicht nur 16, sondern 48 Tage stehen, weshalb diesen und sämtlichen folgenden Kulturen nicht 5, sondern 10 g Glukose zugegeben wurde. Außerdem enthielten diese Kulturen ausnahmsweise nur 0,01 $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$. Der Nährlösung wurde je 0,01 g Stickstoff auf 100 ccm zugefügt. Reihe 1 wurde ohne Stickstoffzusatz hergestellt. Bei der Reihe 2 diente Hefewasser als Stickstoffquelle, das nach den Angaben von Schnegg (1922) bereitet und dessen Stickstoffgehalt nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt worden war. Für die Reihe 3 wurde für das verwendete Asparagin die Formel $C_4H_8O_3N_2 \cdot 1\,H_2O$ zugrunde gelegt, also 0,5357 g Asparagin für das Liter Nährlösung zur Einwage gebracht. Reihe 4 erhielt als Stickstoffquelle ein Ammonsalz und zwar Ammontartrat. Bei Reihe 5 kamen 0,6911 g Pepton (Witte) pro Liter Nährlösung zur Anwendung, dessen Stickstoffgehalt mit 14,47 % festgestellt worden war. Der Stickstoff der Reihe 6 wurde als Kaliumnitrat geboten. Die stickstoffreien Kulturen wurden in der von Schober genau beschriebenen Methode gehalten, um einen möglicherweise vorhandenen Ammoniakgehalt der Luft unschädlich zu machen. Alle Kulturen wurden von 8 zu 8 Tagen analysiert.

Die Hauptergebnisse dieser Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. *Aspergillus niger* Tübingen hatte sein Assimilationsvermögen für atmosphärischen Stickstoff fast gänzlich eingebüßt; das höchste in 48 Tagen erhaltene Myzelgewicht betrug 3,14 mg. — Der ursprüngliche p_H der Nährlösung unterliegt einer Veränderung derart, daß sich rasch eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration einstellt, die alsdann während des ganzen weiteren Kulturverlaufs fast unverändert beibehalten wird. Diese p_H-Stufen sind von der Stickstoffquelle abhängig. Der Stickstoffprozentgehalt der Myzelien ist nach 8 Tagen am höchsten; im weiteren Verlauf der Kulturen ist ein stetiges Abnehmen dieser Kurve

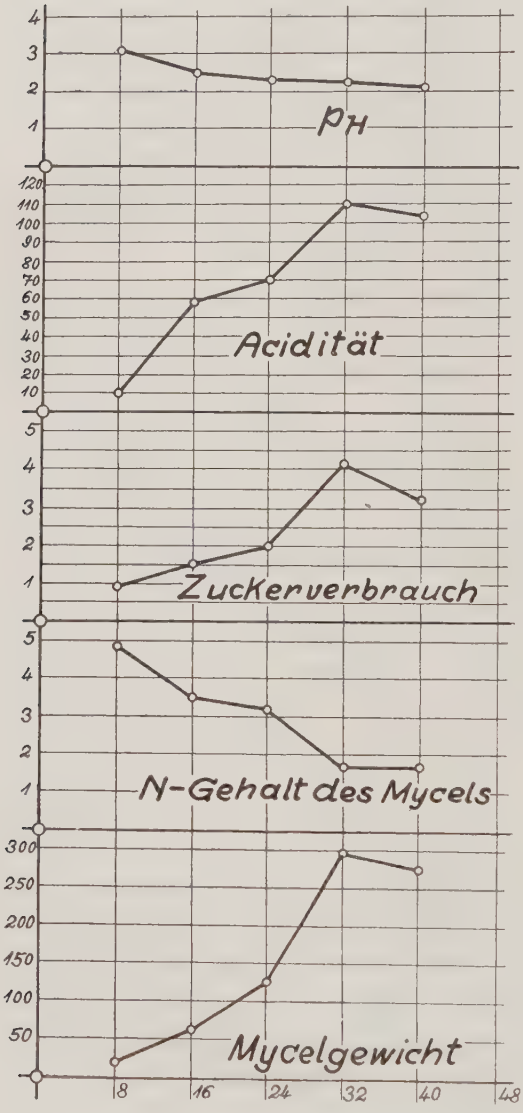


Fig. 1.
Temperatur: 20—22° C.
Azidität ccm n/10 Alkali in 100 ccm Nährlösung,
Zuckerverbrauch in g,
Stickstoffgehalt des Myzels in Prozent.
Myzelgewicht in mg.

zu beobachten. Die Temperatur beeinflußt den Stickstoffprozentgehalt der Myzelien derart, daß bei höherer Temperatur in der jeweiligen Zeiteinheit ein höheres Myzelgewicht und ein geringerer

Stickstoffprozentgehalt als in solchen von niederer Temperatur festzustellen ist. Auffallend ist bei einigen dieser Kulturreihen die Inkonstanz der Zuckerverbrauchskurve; diese steigt nicht immer an, sondern zeigt an einem bestimmten Zeitpunkt plötzlich einen niedereren Verbrauch an Zucker als die 8 Tage vorher analysierte Kultur der gleichen Versuchsreihe. Die Aufführung der sämtlichen Analysentabellen liegt außerhalb des Interesses, es sei hier nur das Kurvenbild irgendeiner Kultur mitgeteilt (vgl. Fig. 1 u. 2, Stickstoffquelle KNO_3, Temperatur 22° u. 32° C).

Man könnte geneigt sein, diese „Neubildung von Zucker" als Fehler anzusehen, wie er bei Massenkulturen nicht immer zu vermeiden ist,

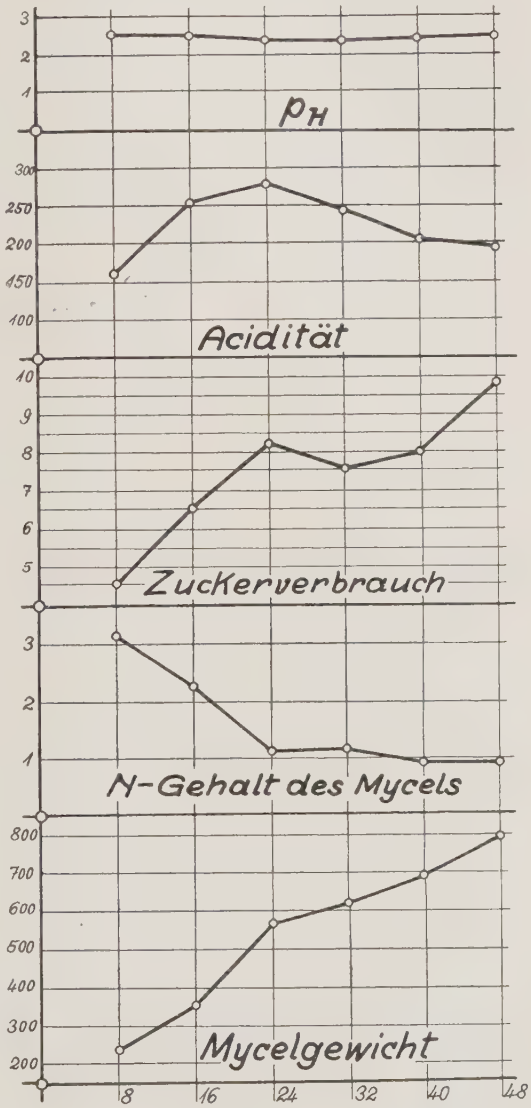


Fig. 2.
Temperatur: 30—32° C,
Azidität ccm n/10 Alkali in 100 ccm Nährlösung,
Zuckerverbrauch in g,
Stickstoffgehalt des Myzels in Prozent,
Myzelgewicht in mg.

bei denen für eine einzelne Kultur die Bedingungen nicht immer mit aller Schärfe kontrollierbar sind. Die Regelmäßigkeit jedoch, mit der diese Erscheinung in den verschiedensten Versuchsreihen

auftrat, und der Vergleich mit den Ergebnissen ganz anderer, später zu besprechender Versuche machen es wahrscheinlich, daß es sich hier nicht um Zufälle handelt, sondern daß faktisch Substanzen aufgetreten sind, die ebenso wie der Zucker das Vermögen besitzen, Fehlingsche Lösung zu reduzieren.

Für die Untersuchung der Beziehung zwischen Säureresistenz und Stickstoffernährung kamen in den endgültigen Versuchen nur zwei Stickstoffquellen zur Anwendung: Kaliumnitrat und Asparagin, also eine anorganische und eine organische. Stickstoffreie Nährlösungen kamen bei unserem Material nicht mehr in Frage, und die anderen, vorher geprüften Stickstoffquellen ließen keinerlei besonderen Effekt erwarten.

2. Hauptversuche.

Bei den folgenden Versuchen galt es einmal das Verhalten auf normaler Nährlösung herangewachsener Myzelien festzustellen, die auf stark angesäuerte Nährmedien gebracht werden (Versuchsreihe B), zum anderen sollte die Keimung und Weiterentwicklung von Sporen, die in Nährlösungen mit den verschiedensten Säuregraden suspendiert waren (Versuchsreihe C), beobachtet werden. Zur Säuerung dienten Salzsäure als anorganische, Oxalsäure als organische Säure. Letztere wurde auch aus dem Grunde gewählt, um, wenn möglich, festzustellen, ob eine besonders auffallende Oxalsäureschädigung, wie sie bei höheren Pflanzen vorkommt, auch bei *Aspergillus niger* zu beobachten ist. Bei den Untersuchungen Schobers (1930) hatte sich gezeigt, daß *Aspergillus niger* Tübingen auf die Zugabe wechselnder Stickstoffmengen verschieden reagiert; um weitere Zusammenhänge in dieser Richtung aufzudecken, wurden bei den Versuchen über die Resistenz gegen verschiedene Säuremengen den Nährlösungen 2 mg, 10 mg oder 50 mg Stickstoff zugefügt.

Im einzelnen wurde bei Versuchsreihe B folgendermaßen verfahren: mit jeder Stickstoffquelle wurden drei Nährlösungen von verschiedener Stickstoffquantität, 2 mg N, 10 mg N und 50 mg N enthaltend, angefertigt. Unter der Voraussetzung, daß analog den Ergebnissen bei anderweitigen Untersuchungen eine größere Abhängigkeit von der aktuellen als von der titrimetrischen Azidität zu erwarten sei, wurden zu den Nährlösungen nicht jeweils die gleichen Mengen n/1 Salz- oder Oxalsäure zugegeben, sondern durch

Versuche drei willkürlich gewählte p_H-Stufen, p_H 1,25, p_H 1,50 und p_H 1,90, mit den beiden Säuren hergestellt. Der zur Erreichung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration erforderliche Säurezusatz ist nicht nur zwischen Salz- und Oxalsäure verschieden, sondern variiert auch in geringem Maße bei den verschiedenen Stickstoffkonzentrationen der Nährlösungen. Die p_H-Werte wurden unter Verwendung von n/1 Säure und Mikrobürette in 20 ccm Nährlösung festgestellt, die genau so vorbehandelt worden war wie die späterhin zum Wachstum verwendeten 100 ccm; das Fünffache der ermittelten Säuremengen wurde den 100 ccm Nährlösung zugesetzt. Die bei 30—32° C herangewachsenen Myzeldecken wurden einerseits nach 8 Tagen, andererseits nach 24 Tagen im Impfkasten halbiert, die eine Hälfte in einer Petrischale mit sterilem, redestilliertem Wasser auf der Unterseite abgespült, auf die angesäuerte Nährlösung gebracht und auf ihr je 10 Tage bei 20—22° C belassen. Dabei zeigte sich, daß eine Regenerierung der halbierten Decke niemals eintrat; vielmehr wurden, wenn die Bedingungen günstig genug waren, neue Myzeldecken ausgebildet, die sich dann über die ganze Oberfläche der Nährlösung erstreckten. Wenn möglich wurden diese Myzeldecken bei der Aufarbeitung der Kulturen gesondert gewogen und auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Eine exakte Trennung war aber nicht in allen Fällen möglich, da die beiden Myzeldecken meist mehr oder weniger stark miteinander verwuchsen.

Bestimmt wurde in den Kulturen ohne Säurezusatz der Ausgangs-p_H, der am Tage der Myzelhalbierung vorhandene p_H, die Azidität, der Zuckerverbrauch, das Gewicht der halben Myzeldecke und ihr Stickstoffprozentgehalt. Dazu kam bei den Kulturen mit Säurezusatz die rechnerisch ermittelte Säureneubildung, sowie die Feststellung von Myzelgewicht und dem Stickstoffprozentgehalt der neuen Myzeldecken. Aus den Tabellen der Ursprungskulturen geht hervor: Mit steigender Stickstoffdosis tritt in der Zeiteinheit eine Erhöhung des Myzelgewichtes ein. Schwankungen im absoluten Myzelgewicht der Kulturen ohne Säurezusatz, die bei Parallelreihen auftreten, dürften auf Temperaturschwankungen zurückzuführen sein. Auch darf nicht vergessen werden, daß Halbierung der Myzeldecken eine ziemlich hohe Fehlerquelle in sich birgt [1]).

1) Die Publikation der analytischen Ergebnisse erfolgt lediglich in Durchschnittswerten, die zu Tabellen zusammengestellt sind. Um Art und Umfang der analytischen Arbeit darzulegen, sind nur wenige Stichproben beigegeben worden, so für die Versuchsreihe B die Tabelle IV.

Eine weitere Abhängigkeit zwischen Stickstoffdosis und Myzel ist, daß bei einer Erhöhung des Stickstoffgehaltes der Nährlösung auch der Stickstoffprozentgehalt des Myzels ein höherer wird. Dieser von der Stickstoffdosis abhängige Prozentsatz ist aber, wie aus den Tabellen hervorgeht, nahezu unabhängig von der Stickstoffquelle. Die folgende Tabelle I der Durchschnittswerte der Myzelgewichte und ihrer Stickstoffprozente zeigt diese Unabhängigkeit sehr deutlich bei 2 mg N. Die Zeit, ob 8 oder 24 Tage, ist hierbei ohne Einfluß. Bei 10 mg und 50 mg Stickstoff tritt in Kulturen mit Kaliumnitratzusatz, vielleicht durch den erhöhten Kaliumgehalt bedingt, stärkeres Wachstum ein als in denen mit Asparagin. Mit diesem stärkeren Myzelwachstum geht eine Abnahme des Myzelstickstoffgehaltes Hand in Hand.

Tabelle I.

Durchschnittswerte der Tabellen B ohne Säurezusatz.

Stickstoffquelle:	Kulturdauer: 8 Tage				Kulturdauer: 24 Tage			
	KNO_3		Asparagin		KNO_3		Asparagin	
	Myz.-Gew. mg	% N	Myz.-Gew. mg	% N	Myz.-Gew. mg	% N	Myz.-Gew. mg	% N
2 mg N . . .	31,0	1,82	29,9	1,73	70,6	0,92	70,0	0,97
10 „ „ . . .	69,6	3,88	46,0	5,03	199,6	1,49	188,7	1,63
50 „ „ . . .	70,9	4,27	57,3	5,27	370,5	2,97	226,5	3,57

Durchschnittsmyzelgewicht und Durchschnittswerte des Stickstoffprozentgehaltes der Myzelien.

Der Zuckerumsatz in den säurefreien Kulturen (Tab. II) verläuft derart, daß der Zuckerverbrauch, unabhängig von der Stickstoffquelle, sowohl mit steigender Stickstoffmenge, als auch längerer Kulturdauer zunimmt. Die Stickstoffquelle ist insofern von Einfluß, als bei Kaliumnitrat und Asparagin in geringer Konzentration ziemliche Übereinstimmung im Zuckerverbrauch herrscht, während sonst, mit Ausnahme von 10 mg N als KNO_3 bei 24 Tagen Kulturdauer, in den Asparaginkulturen mehr Zucker verbraucht wird.

Tabelle II.

Stickstoffquelle:	Kulturdauer: 8 Tage		Kulturdauer: 24 Tage	
	KNO_3 Zuckerverbrauch g	Asparagin Zuckerverbrauch g	KNO_3 Zuckerverbrauch g	Asparagin Zuckerverbrauch g
2 mg N . . .	1,48	1,33	1,62	1,76
10 „ „ . . .	2,87	3,43	7,08	6,52
50 „ „ . . .	2,29	3,94	8,87	10,0

Durchschnittszuckerverbrauch der säurefreien Kulturen.

Dabei ist das mit Asparagin erreichte Durchschnittsmyzelgewicht stets geringer als das der entsprechenden Kaliumnitratkultur. Vergleicht man den Zuckerverbrauch der säurehaltigen Kulturen mit dem der jeweiligen Ausgangskultur (8 + 10 Tage), so zeigt sich, daß dieser Verbrauch in den Säurekulturen ein viel geringerer ist. Dabei ist zu beachten, daß das Myzelgewicht bei Säurezusatz trotzdem in 10 Tagen oft das Doppelte bis Vielfache der 8tägigen, säurefreien Kultur erreicht. In den 24tägigen Kulturen liegen die Verhältnisse ähnlich; doch lassen sich die Werte wegen der verschieden langen Kulturdauer (24 + 10 Tage) nicht so gut vergleichen. Bei 50 mg Stickstoff, gegeben als Kaliumnitrat, wird in den säurehaltigen Kulturen (8 + 10 Tage) teilweise etwas mehr verbraucht als in den Ausgangskulturen. Dámit tritt aber gleichzeitig eine Verfünf- bis Versiebenfachung des ursprünglichen Myzelgewichtes ein.

Merkwürdig ist das verschiedentliche Auftreten von Zuckerwerten, die höher liegen als der ursprünglich zugesetzte Zuckerbetrag, eine Erscheinung, die als „Zuckerzunahme" schon in den Vorversuchen beobachtet wurde. Die absoluten Werte der Zuckerzunahme liegen zwar der Fehlergrenze bedenklich nahe; ihr Auftreten ist aber andererseits so gesetzmäßig, daß es auf eine andere Ursache schließen läßt. Es könnte sich um irgendeine Aldehydbildung handeln, hervorgerufen durch starke Autolyse, Abbau von Eiweißstoffen, oder um eine Erscheinung, wie sie bei gärender Hefe, Bakterien und auch *Aspergillus* nachgewiesen wurde, nämlich um die Bildung von Azetaldehyd bei der Umsetzung von Zucker, dessen weitere Verarbeitung unter diesen extremen Kulturbedingungen nicht möglich wäre. Doch gibt es noch eine andere Erklärungsmöglichkeit; ordnet man die Myzelien nach ihrem Stickstoffgehalt an (Tab. III) und vergleicht die säurefreien Kulturen mit den säurehaltigen, die einen Ausgangs-p_H 1,25 aufweisen, so tritt bis zu einem bestimmten Stickstoffgehalt, der zwischen 2,3 und 2,8% liegt, eine regelmäßige Abnahme des Ausgangsmyzelgewichtes in den säurehaltigen Kulturen ein. Gerade in diesen Kulturen ist meist eine „Zuckerzunahme" zu verzeichnen. Bei jeder „Zuckerneubildung" tritt bis auf eine Ausnahme zugleich eine geringe Zunahme des Stickstoffprozentgehaltes des Myzels auf. Diese Zusammenhänge lassen sich wohl am einfachsten dadurch erklären, daß man irgendeinen Stoff annimmt, der im Pilz vorhanden ist und der die Eigenschaft hat, unter gewissen Bedingungen aus dem Myzel herauszutreten, wobei

er eine reduzierende Wirkung annimmt. Ein solcher Körper findet sich im Glykogen, das von Fernbach für *Aspergillus niger* nachgewiesen wurde; das Glykogen zerfällt bei Säurehydrolyse quantitativ in Glukose (Karrer, 1928). Damit wäre einmal das Auftreten des Zuckerzuwachses erklärt, zum anderen ließe sich damit auch die Gewichtsabnahme und, bei absolut gleichbleibendem Stickstoffgehalt, eine Erhöhung des Stickstoffprozentgehaltes im Myzel in Einklang bringen.

Tabelle III.

Nr. der Kultur	Stickstoffprozentgehalt des Myzels nach Tagen 8	8 + 10	Ausgangsmyzelgewicht mg	Gewichtsverlust oder Zunahme in 10 Tagen	Zuckerverbrauch g
			Stickstoffquelle: KNO_3		
8	0,95	1,03	76,3	— 27,1	+ 0,14
2	0,98	1,00	73,0	— 11,7	+ 0,23
4	1,46	1,62	212,8	— 19,2	+ 0,30
10	1,63	1,64	183,8	— 10,1	+ 0,10
1	1,93	1,69	29,83	— 8,63	— 1,15
7	2,30	1,63	25,12	— 0,38	— 0,56
12	2,83	3,09	357,4	+ 79,7	— 0,36
6	3,12	2,75	326,5	— 23,8	+ 0,71
3	4,15	2,57	77,3	+ 79,9	— 0,47
9	4,15	3,03	46,8	+ 137,0	— 1,48
11	4,17	4,26	89,4	+ 77,4	— 1,13
5	4.24	4,08	61,87	+ 96,13	— 1,21
			Stickstoffquelle: Asparagin.		
20	0,98	1,14	62,7	— 5,7	+ 0,19
14	0,98	1,31	66,7	— 1,7	+ 0.23
19	1,45	3,31	37,7	+ 1,65	— 1,03
16	1,52	1,55	217,9	— 55,8	+ 0,18
22	1.64	1,50	178,9	— 18,3	— 0,15
13	2,22	1,97	25,8	— 4,43	— 1,98
18	3,41	3,92	204,6	+ 367,7	— 2,26
24	3,61	3,31	274,0	— 97,1	— 0,10
21	4,99	3,60	27,18	+ 21,2	— 0,59
15	5,12	2,52	59,7	+ 99,6	— 1,56
23	5,23	4,19	48,7	+ 227,3	— 1,17
17	5,30	3,69	66,9	+ 324,1	— 2,32

Die Säurebildung ist in allen Kulturen mit Säurezusatz auf ein derartiges Minimum beschränkt, daß man geradezu von einer Sistierung der Säurebildung sprechen kann. So findet offenbar fast der gesamte verbrauchte Zucker zum Aufbau neuen Myzels Verwendung, wodurch das Myzelgewicht relativ hoch wird, obwohl im Gegensatz zu säurebildenden Kulturen der Zuckerverbrauch sehr gering bleibt.

Tabelle IV.

2 mg Stickstoff als KNO_3 und Salzsäure.

Kultur Nr. 7	8 Tage ohne Säurezusatz			8 + 10 Tage mit Säurezusatz			Kultur Nr. 8	24 Tage ohne Säurezusatz			24 + 10 Tage mit Säurezusatz		
Ausgangs-p_H	3,51	3,51	3,51	1,25	1,50	1,90		—	—	—	1,25	1,50	1,90
p_H nach 8 Tagen . .	2,76	2,74	2,98	1,29	1,82	1,95	p_H nach 24 Tagen . .	2,64	2,66	2,69	1,26	1,46	1,91
Azidität nach 8 Tagen							Azidität nach 24 Tagen						
ccm n/10. . . .	33,4	33,0	16,9	62,7	42,5	22,5	ccm n/10	37,2	34,4	33,0	62,2	43,0	21,8
Zugesetzte Säure . . .	—	—	—	54,0	34,5	1,38		—	—	—	34,0	34,5	13,8
Säurebildung	—	—	—	8,7	8,0	8,7		—	—	—	8,2	8,5	8,0
Zuckerverbrauch g . .	1,46	1,42	1,53	0,56	0,78	0,33		1,80	1,56	2,10	+ 0,14	+ 0,33	+ 0,42
Myzelgewicht mg . .	25,12	25,56	43,42	24,74	36,47	100,7		76,3	73,0	56,6	49,2	56,9	61,8
% N	2,03	2,19	1,36	1,63	2,13	1,56		0,95	1,06	0,99	1,03	1,08	0,99
Neue Decke mg . . .	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	36,38
% N	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	2,46

50 mg Stickstoff als KNO_3 und Salzsäure.

Kultur Nr. 11	8 Tage ohne Säurezusatz			8 + 10 Tage mit Säurezusatz			Kultur Nr. 12	24 Tage ohne Säurezusatz			24 + 10 Tage mit Säurezusatz		
Ausgangs-p_H	3.52	3,52	3,52	1,25	1,50	1.90		—	—	—	1,25	1,50	1,90
p_H nach 6 Tagen . .	2,78	2,78	2,79	1,36	1,89	2,11	p_H nach 24 Tagen . .	2,21	2,19	2,32	1,40	2,32	2,68
Azidität nach 8 Tagen							Azidität nach 24 Tagen						
ccm n/10	65,0	76,2	70,8	55,4	37,5	51,8	ccm n/10	253,9	241,6	227,0	61,2	24,0	62,4
Zugesetzte Säure . .	—	—	—	52,0	33,0	13,1		—	—	—	52,0	33,0	13,1
Säurebildung	—	—	—	3,4	4,5	38,7		—	—	—	9,2	— 9,0	49,3
Zuckerverbrauch g . .	2,34	2,78	2,77	1,13	3,36	2,80		8,68	8,90	9,76	0,36	3,26	3,92
Myzelgewicht mg . .	89,4	104,5	85,6	166,8	550,6	495,6		357,4	382,7	416,5	437,1	872,5	468,3
% N	4,17	4,00	4,19	4,26	3,85	3,26		2,83	2,81	2,97	3,09	2,39	2,13
Neue Decke mg . . .	—	—	—	—	—	73,4		—	—	—	—	155,9	669,3
% N	—	—	—	—	—	3,73		—	—	—	—	3,92	3,81

Die Versuchsreihe C wurde mit den gleichen Stickstoffquellen und -dosen wie die Versuchsreihe B angesetzt. Als Versuchsgefäße dienten Neutralglas-Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt, die 20 ccm Nährlösung enthielten. Jedem Kölbchen wurde eine bestimmte Menge Salz- oder Oxalsäure zugesetzt; der p_H dieser Lösung wurde in einer Parallelreihe ermittelt. Die Kultur dauerte 10 Tage, die Temperatur betrug 30—32° C; untersucht wurde das Verhalten von *Aspergillus niger* Tübingen Stamm 5 und Stamm 6. Bei der Aufarbeitung wurden die p_H-Werte, das Myzelwachstum, der Stickstoffprozentgehalt des Myzels sowie dessen Gesamtstickstoff ermittelt. In einer Vergleichung der erhaltenen Tabellen zeigt bei Berechnung der Durchschnitts-Myzelgewichte Stamm 6 mit einer Dosis von 50 mg N gegenüber Stamm 5 eine deutliche Überlegenheit; diese tritt bei Kaliumnitrat und auch bei Asparagin als Stickstoffquelle zutage. Bei niederen Stickstoffdosen ist ein mehr oder weniger starker Ausgleich vorhanden.

Die folgenden Versuchsergebnisse sind ebenfalls auf Grund des Tabellenmaterials von Versuchsreihe C ermittelt worden. Aus der großen Anzahl seien hier die direkten Zahlenwerte von Stamm 6 mitgeteilt, und zwar diejenigen, bei denen als Stickstoffquelle Asparagin, als Säure aber Oxalsäure diente (Tab. V). Diese Werte, wie auch die hier nicht veröffentlichten, zeigen: Das jeweilige Maximum des Myzelwachstums wird durch die Stickstoffdosis beeinflußt; wird die gebotene Stickstoffmenge verkleinert, so liegt das Maximum bei einer geringeren Wasserstoffionenkonzentration. Eine weitere Beeinflussung durch die Stickstoffdosis, unabhängig von der Stickstoffquelle, ist der Verlauf der Myzelgewichtskurve. Bei geringer Stickstoffdosis fällt die Kurve ziemlich gleichmäßig ab, während bei erhöhter Stickstoffgabe stets ein plötzliches Absinken von hohen Myzelgewichten auf einige Milligramm innerhalb einer oder höchstens zweier p_H-Stufen festzustellen ist. Gleichzeitig wirkt sich der Stickstoffgehalt der Myzelien auf die Säureresistenz derart aus, daß bei höherem Stickstoffgehalt an der p_H-Grenze, an der eben noch Wachstum stattfindet, ein wesentlich erhöhtes Myzelwachstum gegenüber den Kulturen mit geringem Stickstoffgehalt auftritt. Eine weitere Abhängigkeit besteht auch zwischen dem p_H und dem Stickstoffprozentgehalt des Myzels. Abgesehen von einigen Schwankungen in den Anfangswerten ist deutlich die Neigung vorhanden, daß bei steigender Wasserstoffionenkonzentration eine Steigerung des Stick-

Tabelle V.

Stamm 6. 2 mg N = Asparagin und Oxalsäurezusatz.

Nr.	Zugesetzte Säuremenge ccm n/10	Ausgangs-pH	pH nach 10 Tagen	Myzelgewicht mg	% N im Myzel	Gesamt-N mg
1	0,0	3,32	2,60	21,24	1,71	0,364
2	0,6	1,92	1,84	19,54	1,85	0,361
3	1,2	1,59	1,64	15,61	1,57	0,246
4	1,8	1,47	1,53	12,81	1,99	0,255
5	2,4	1,40	1,43	10,39	2,26	0,235
6	3,0	1,31	1,34	8,93	2,67	0,238
7	3,6	1,26	1,26	5,28	—	—
8	4,2	1,22	1,21	4,54	—	—
9	4,8	1,17	1,17	2,89	—	—
10	5,4	1,14	1,12	—	—	—

Stamm 6. 10 mg N = Asparagin und Oxalsäurezusatz.

Nr.	Zugesetzte Säuremenge ccm n/10	Ausgangs-pH	pH nach 10 Tagen	Myzelgewicht mg	% N im Myzel	Gesamt-N mg
1	0,0	3,41	2,12	59,92	2,74	1,643
2	0,6	1,98	1,95	79,10	2,14	1,695
3	1,2	1,67	1,79	76,55	2,13	1,628
4	1,8	1,52	1,69	73,78	1,95	1,441
5	2,4	1,42	1,48	67,13	1,94	1,299
6	3,0	1,31	1,34	51,17	2,33	1,190
7	3,6	1,28	1,26	25,05	4,51	1,130
8	4,2	1,23	1,19	9,64	6,03	0,581
9	4,8	1,18	1,19	5,57	—	—
10	5,4	1,16	1,12	0,55	—	—

Stamm 6. 50 mg N = Asparagin und Oxalsäurezusatz.

Nr.	Zugesetzte Säuremenge ccm n/10	Ausgangs-pH	pH nach 10 Tagen	Myzelgewicht mg	% N im Myzel	Gesamt-N mg
1	0,0	3,69	2,22	83,1	4,59	3,816
2	0,6	2,27	2,07	125,9	3,97	4,999
3	1,2	1,85	1,77	166,9	3,54	5,910
4	1,8	1,67	1,64	180,9	4,01	7,250
5	2,4	1,52	1,59	162,9	4,27	6,948
6	3,0	1,42	1,64	184,9	3,70	6,837
7	3,6	1,37	1,40	143,7	4,79	6,876
8	4,2	1,30	1,33	146,2	5,20	7,601
9	4,8	1,25	1,26	110,2	5,63	6,206
10	5,4	1,23	1,08	8,3	6,49	0,539

stoffprozentgehaltes der Myzelien eintritt, während das Myzelgewicht abnimmt. Es bleibe hier unentschieden, ob dies eine direkte Abhängigkeit ist, oder ob die Sache so liegt, daß bei jedem Auskeimen und Weiterwachsen von *Aspergillus*-Sporen erst eine bestimmte, von der Stickstoffquelle und deren Konzentration, sowie sonstigen Faktoren abhängige Stickstoffmenge im Myzel angereichert wird, mit deren Hilfe alsdann das Weiterwachsen erfolgt, ein Schluß, auf den die starke Übereinstimmung des Gesamtstickstoffgehaltes der Myzelien bei bestimmten Kulturbedingungen hinzuweisen scheint.

Aus den Tabellen der Versuchsreihe C wurden ferner die Durchschnittswerte der assimilierten Gesamtstickstoffmenge errechnet und diese Werte in Prozenten der gebotenen Stickstoffmenge ausgedrückt (Tab. VI). Das Maximum der Stickstoffausnutzung liegt nach dieser Tabelle bei Salzsäurezusatz und 2 mg Stickstoff, geboten als Kaliumnitrat. Bei steigender Stickstoffdosis nimmt das Maximum ab, was sowohl für Kaliumnitrat

Tabelle VI.

	Salzsäure:		Oxalsäure:	
	Prozentualer Stickstoffverbrauch	Myzelgewicht mg	Prozentualer Stickstoffverbrauch	Myzelgewicht mg
Stamm 5.	Stickstoffquelle: KNO_3.			
2 mg N	13,95	13,21	13,98	11.51
10 „ „	12,92	28,69	14,25	35,32
50 „ „	3,31	35,39	4,70	38,65
Stamm 6.	Stickstoffquelle: KNO_3.			
2 mg N	15,30	11,24	14,35	10,18
10 „ „	13,88	26,05	13,99	33,32
50 „ „	4,98	53,53	5,50	57.29
Stamm 5.	Stickstoffquelle: Asparagin.			
2 mg N	13,63	15.51	12,80	9,54
10 „ „	13,08	49,04	12,02	52,59
50 „ „	9,46	106,10	10,58	120,30
Stamm 6.	Stickstoffquelle: Asparagin.			
2 mg N	16,33	15,64	14,15	11,25
10 „ „	16,06	55,39	13,26	44,85
50 „ „	10,33	121,70	11,39	131,30

Durchschnittswerte der Myzelgewichte und der assimilierten Stickstoffmenge, ausgedrückt in Prozenten der gebotenen Stickstoffdosis.

als auch für Asparagin gültig ist. Mit 50 mg Stickstoffgabe ist der Prozentsatz der verbrauchten Stickstoffmenge bei Kaliumnitrat um die Hälfte bis $^2/_3$ geringer als bei Asparagin, entsprechend einer wesentlich geringeren Myzelbildung; bis auf eine Ausnahme zeigt Stamm 6 in allen Versuchen eine höhere Prozentzahl an verbrauchtem Stickstoff. Stamm 5 weist bei niederen Stickstoffdosen das höhere Myzelgewicht gegenüber Stamm 6 auf; bei 50 mg Stickstoff tritt eine Umkehrung ein, so daß hier das Myzelgewicht von Stamm 6 in allen Versuchen dominiert. — Die assimilierte Gesamtstickstoffmenge (Tab. VII) ist, bei gleicher Temperatur und Kulturdauer, abhängig von der Stickstoffquelle, indem bei 50 mg Stickstoff, geboten als Asparagin, etwa die doppelte Gesamtstickstoffmenge wie bei Kaliumnitrat auftritt. Gleichzeitig wird das Myzelgewicht beträchtlich erhöht. Beim weiteren Vergleich der Ergebnisse der Kaliumnitratkulturen mit denen von Asparagin zeigte sich, daß bei einem Verhältnis der Oberfläche zum Volumen von 123 : 100 (Versuchsreihe C) die

Tabelle VII.

Durchschnittsgewichte der Myzelien und die Werte ihres Gesamtstickstoffgehaltes.

	Salzsäure:		Oxalsäure:	
	Myzelgewicht mg	Gesamtstickstoffgehalt des Myzels mg	Myzelgewicht mg	Gesamtstickstoffgehalt des Myzels mg
Stamm 5.	Stickstoffquelle: KNO_3.			
2 mg N	13,21	0,279	11,51	0,280
10 „ „	28,69	1,29	35,32	1,43
50 „ „	35,35	1,65	38,65	2,35
Stamm 6.				
2 mg N	11,24	0,306	10,18	0,269
10 „ „	26,05	1,39	33,32	1,40
50 „ „	53,53	2,49	57,29	2,75
Stamm 5.	Stickstoffquelle: Asparagin.			
2 mg N	15,51	0,273	9,54	0,256
10 „ „	49,04	1,31	52,59	1,20
50 „ „	106,1	4,75	120,3	5,29
Stamm 6.				
2 mg N	15,64	0,327	11,25	0,283
10 „ „	55,39	1,606	44,85	1,33
50 „ „	121,7	5,17	131,3	5,60

oben erwähnte Dominanz des Asparagins bei einer Stickstoffdosis von 50 mg auftritt, während umgekehrt in Versuchsreihe B bei einem Verhältnis 75,5 : 100 die Kaliumnitraternährung derjenigen mit Asparagin unter allen Umständen überlegen ist. Bei Zusammenstellung der p_H-Stufen, bei denen eben noch Myzelwachstum erfolgt (Tab. VIII), ergibt sich die Tatsache, daß die wachstumshemmende Wirkung der angewandten Säuren stets bei einer verschiedenen Wasserstoffionenkonzentration liegt, und zwar derart, daß bei Oxalsäure in allen Fällen eine starke Wasserstoffionenkonzentration ertragen wird. Zwischen den Stämmen 5 und 6 bestehen gewisse Unterschiede; doch sind diese nicht sehr stark ausgeprägt. Nur mit Kaliumnitrat und Salzsäure ist bei Stamm 6 eine wesentlich größere Resistenz als bei Stamm 5 festzustellen; andererseits wird Oxalsäure bei Asparagin als Stickstoffquelle von Stamm 5 um ein Geringes besser vertragen. Aus dem Vorhergehenden ergibt sich somit: Das Wachstum ist in der Hauptsache von dem p_H abhängig. Die zugesetzte absolute Oxalsäuremenge kann bis zum Zwanzigfachen der eben noch erträglichen Salzsäure betragen. Das Myzelwachstum wird nicht durch eine konstante Wasserstoffionenkonzentration gehemmt; die Hemmung liegt vielmehr bei einem durch die Stickstoffquelle und die jeweilige Säure bedingten p_H. Dabei zeigt sich, daß bei Oxalsäurezusatz stets eine größere Konzentration ertragen wird.

Tabelle VIII.

	Salzsäure:		Oxalsäure:	
	Stamm 5	Stamm 6	Stamm 5	Stamm 6
	p_H	p_H	p_H	p_H
Stickstoffquelle: KNO_3.				
2 mg N	1,66	1,38	1,23	1,27
10 „ „	1,65	1,37	1,40	1,24
50 „ „	1,95	1,54	1,34	1,33
Stickstoffquelle: Asparagin.				
2 mg N	1,43	1,43	1,14	1,17
10 „ „	1,48	1,48	1,12	1,12
50 „ „	1,48	1,57	1,04	1,08

p_H-Stufen, bei denen eben noch Wachstum erfolgt.

Wie erwähnt, zeigten sich bei Versuchsreihe C die größten Unterschiede zwischen den Stämmen 5 und 6 bei Kaliumnitrat-

ernährung und Salzsäurezusatz. Diese Bedingungen wurden nunmehr gewählt, um in Versuchsreihe D die Differenzen zwischen den im Institut vorhandenen anderweitigen *Aspergillus*-Rassen festzustellen, insbesondere auch, um zu sehen, ob das plötzliche Abfallen der Myzelgewichtskurve aller dieser *Aspergillus*-Rassen an derselben p_H-Stufe liegt wie bei *Aspergillus niger* Tübingen. Die Nährlösung enthielt 50 mg Stickstoff, geboten als Kaliumnitrat, die Temperatur betrug 30—32° C. Verwendet wurde für die gesamte Versuchsreihe eine Nährlösung, die aus ein und demselben Kolben stammte, um möglichste Gleichheit zu erzielen. Die Nährlösung wurde zweimal in strömendem Dampf sterilisiert und dann direkt aus ihrem Kolben im sterilen Impfkasten in die sterilen Kulturgefäße abbürettiert. Dies geschah mit Hilfe einer besonderen Einrichtung, wie sie ähnlich bei maßanalytischen Flüssigkeiten benutzt wird, um diese aus ihrem Aufbewahrungsgefäß direkt in die Bürette füllen zu können, ohne die Flasche öffnen zu müssen. Auf diese Weise fiel ein Sterilisieren der Nährlösung in den einzelnen Versuchskölbchen weg, was nicht nur eine geringere Veränderungsmöglichkeit bedeutet, sondern auch eine gleichmäßige Quantität der Nährlösungsmenge in den einzelnen Versuchsgefäßen garantiert. Der Säurezusatz erfolgte auch hier als n/1-Säure, um zu starke Differenzen der Nährlösungsmenge zu vermeiden. Nach zehntägiger Versuchsdauer ergaben sich folgende Resultate: Mit einer Ausnahme liegt bei den untersuchten *Aspergillus*-Rassen der starke Abfall der Myzelgewichtskurve zwischen p_H 2,25 und p_H 1,52; nur bei *Aspergillus niger ficuus* beginnt dieser Abfall bei unseren Kulturbedingungen schon zwischen p_H 2,50 und 2,26. *A. niger* var. *altipes*, *A. cinnamomeus montanus* und besonders *A. niger Bassiae* verringern während der zehntägigen Kulturdauer die Wasserstoffionenkonzentration in den ersten drei p_H-Stufen in auffälligem Maße. Diese Verringerung tritt bei *A. niger* Göttingen und den verschiedenen Stämmen von *A. niger* Tübingen nur in den beiden ersten p_H-Stufen auf. Die schon in Versuchsreihe C festgestellte Erscheinung, daß in Kulturen mit Säurezusatz kaum eine Säurebildung eintritt, läßt sich auch bei den Versuchen D beobachten. Zieht man von der nach zehn Tagen erhaltenen Azidität die zugesetzte Säuremenge ab, so erhält man Werte, die fast immer unter der ursprünglichen Azidität der Nährlösung liegen (Tab. IX). Es tritt also eine Verminderung der Azidität ein; auf welche Weise diese Verminderung vor sich geht,

Tabelle IX.

Vergleich der Säureresistenz verschiedener Rassen von *Aspergillus niger*.

\+ vor den Zahlenwerten bedeutet Säurezunahme, — Säureabnahme.

Blind	I	II	III	IV
Ausgangs-p_H	1,73	1,59	1,50	1,42
p_H nach 10 Tagen	1,71	1,57	1,48	1,41
Gesamtazidität ccm n/10	5,97	7,22	8,41	9,65
Zugesetzte Säure ccm n/10	3,60	4,80	6,0	7,2
Azidität der Nährlösung	2,37	2,42	2,41	2,45

	Aspergillus niger var. *altipes*				*Aspergillus cinnamomeus montanus*				*Aspergillus niger Bassiae*			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
p_H nach 10 Tagen	2,09	2,14	1,83	1,40	2,51	2,14	1,68	1,38	2,33	2,12	2,0	1,59
Gesamtazidität ccm n/10	9,51	6,37	5,51	9,53	5,07	4,67	6,44	9,49	4,02	6,11	8,33	7,48
Säure-Zu- oder Abnahme ccm n/10	3,54	—0,85	—2,90	—0,12	—0,90	—2,55	—1,97	—0,16	—1,95	—1,11	—0,08	—2,17
Myzelgewicht mg	165,16	163,58	91,58	2,62	49,50	52,45	29,01	3,03	118,7	139,2	158,7	80,88
N-Prozentgehalt des Myzels	2,74	2,68	3,56	—	5,04	5,83	3,69	—	2,54	2,56	2,78	3,53
Gesamtstickstoff des Myzels mg	4,53	4,38	3,26	—	2,49	2,99	1,07	—	3,02	3,56	4,42	2,86

	Aspergillus niger ficuus				*Aspergillus niger* Göttingen				*Aspergillus niger* Tübingen Stamm 6			
p_H nach 10 Tagen	2,47	2,50	2,26	1,39	2,19	1,92	1,56	1,38	2,47	2,23	1,58	1,40
Gesamtazidität ccm n/10	24,41	15,03	2,80	9,49	5,65	5,33	7,04	9,49	6,11	4,14	6,90	9,07
Säure-Zu- oder Abnahme ccm n/10	+ 18,44	+ 7,81	+ 5,61	—0,16	—0,32	1,99	—1,37	—0,16	+ 0,14	—3,08	—1,51	—0,58
Myzelgewicht mg	137,7	145,5	82,05	1,75	67,37	52,72	16,83	1,26	91,38	95,30	15,45	1,16
N-Prozentgehalt des Myzels	3,57	2,75	5,60	—	4,36	4,78	4,75	—	3,45	2,96	6,39	—
Gesamtstickstoffgehalt des Myzels mg	4,92	3,98	4,60	—	2,95	2,52	0,799	—	3,15	2,82	0,987	—

ist aus den Analysenresultaten nicht ersichtlich; es kann sich dabei um Neutralisation der zugesetzten Säure durch das Kaliumion handeln, das durch Verbrauch des NO_3-ions frei wird. — Eine starke Säuerung bringt von allen Kulturen nur *Aspergillus niger ficuus* zuwege.

Auf die sonstigen Ergebnisse einzugehen, erübrigt sich, da sie mit den in Versuchsreihe C erhaltenen Resultaten übereinstimmen; hingewiesen sei noch auf die teilweise recht beträchtlichen Gewichtsdifferenzen der verschiedenen Myzelien; dies muß als Rasseneigentümlichkeit angesehen werden, der unter unseren Kulturbedingungen eine mehr oder weniger große Wachstumsintensität entspricht. Nicht genug betont werden kann, daß alle unsere Ergebnisse nicht als absolute Gesetzmäßigkeiten aufgefaßt werden dürfen, sondern stets nur im engsten Zusammenhang mit ihren Kulturbedingungen Gültigkeit haben. Bei Nichtbeachtung dieser Voraussetzung lassen sich sonst Irrtümer nicht vermeiden. Darauf wird im nächsten Abschnitt noch speziell hingewiesen werden.

Nachdem in den vorhergehenden Experimenten versucht worden war, physiologische Differenzen verschiedener *Aspergillus*-Rassen in bezug auf Stickstoffernährung und Säureresistenz festzustellen, sollte der zweite Teil unserer Arbeit dazu dienen, die Zusammenhänge der aufgetretenen Unterschiede des Sporulationsvermögens unseres *Aspergillus niger* Tübingen aufzudecken. Ehe auf die dabei gewonnenen Erfahrungen eingegangen wird, möge eine Zusammenfassung der seitherigen Ergebnisse folgen.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt III.

1. Die von Schober verwendeten *Aspergillus*-Rassen haben bei Weiterkultur auf Malzagar verschiedene Veränderungen erfahren; sie haben beispielsweise das Vermögen, Luftstickstoff zu assimilieren und Zitronensäure zu bilden, nahezu völlig verloren.

2. In Kulturen von *Aspergillus niger* Tübingen Stamm 5 stellt sich bei den hier verwendeten geringen Stickstoffkonzentrationen nach einiger Zeit ein bestimmter p_H ein, der beibehalten wird und der von der Größe der jeweiligen Stickstoffdosis abhängig ist.

3. Auf normalen Nährlösungen tritt bei gleicher Zeit und Temperatur infolge einer Erhöhung der Stickstoffdosis eine Erhöhung

der Myzelgewichte auf, sowie eine Erhöhung des prozentualen Stickstoffgehaltes der Myzelien.

4. Bei Asparagin als Stickstoffquelle wird im allgemeinen mehr Zucker verbraucht als bei Kaliumnitrat.

5. Der Zuckerverbrauch in säurehaltigen Kulturen ist wesentlich geringer als der in säurefreien. Dabei wird aber oft das Vielfache an Myzel gebildet.

6. Eine scheinbare „Neubildung von Zucker" wird auf das Vorhandensein von Glykogen zurückgeführt, das der Säurehydrolyse unterliegt.

7. Die Säurebildung ist in Kulturen mit Säurezusatz nahezu gehemmt.

8. Bei fortlaufend erhöhten Säurezusätzen und geringen Stickstoffgaben wird das Myzelgewicht kontinuierlich vermindert; bei hohen Stickstoffdosen erfolgt dagegen ein plötzlicher Abfall der Myzelgewichtskurve nach Erreichung eines bestimmten p_H.

9. Der Stickstoff wird in diesen Versuchen bei kleinen Stickstoffdosen am besten ausgenützt.

10. Die p_H-Stufe, bei der eben noch Wachstum erfolgt, ist abhängig von den zugesetzten Säuren. Bei Oxalsäurezusatz wird stets eine höhere Wasserstoffionenkonzentration vertragen als bei Salzsäurezusatz.

11. Der bei hohen Stickstoffdosen und Säurezusatz beobachtete plötzliche Myzelgewichtsabfall liegt für alle untersuchten *Aspergillus*-Rassen zwischen p_H 2,25 und p_H 1,52. Nur bei *A. niger ficuus* liegt er zwischen p_H 2,50 und p_H 2,26.

12. Der durch verschiedene Kulturbedingungen variierende Gehalt des Myzels an Stickstoff beeinflußt die Säureresistenz des Pilzes insofern, als bei höherem Stickstoffgehalt an der jeweiligen p_H-Grenze, die gerade noch Wachstum zuläßt, ein unverhältnismäßig stärkeres Wachstum erfolgt als bei geringem Stickstoffgehalt.

Abschnitt IV.

Untersuchungen über Rassenbildung bei *Aspergillus niger*.

Eingangs der Arbeit wurde mitgeteilt, daß sich bei unseren Untersuchungen über *Aspergillus niger* Tübingen eigenartige Unterschiede im Sporulationsvermögen auf Biomalzagar gezeigt hatten. Auf verschiedenes physiologisches Verhalten hatten wir zwei dieser

Stämme, Stamm 5 und Stamm 6, in den vorhergehenden Untersuchungen über Säureresistenz geprüft. Bevor auf die weiteren experimentellen Daten über Rassenbildung bei *Aspergillus niger* Tübingen eingegangen wird, sei ein kurzer Überblick der in dieser Richtung bereits vorliegenden Veröffentlichungen vorausgeschickt.

Im Rahmen dieser Arbeit auf die zahllosen, in den letzten Jahrzehnten erfolgten Veröffentlichungen über Vererbung bei Mikroorganismen einzugehen, würde zu weit führen. Literaturangaben darüber befinden sich besonders in den Arbeiten von Klein (1912), Eisenberg (1912/14) und Jollos (1914 u. 1921). Auch die nun zu besprechenden Mitteilungen über aufgetretene Veränderungen bei *Aspergillus niger* enthalten zahlreiche Hinweise. Wehmer (1891) hatte in einer ausführlichen Arbeit über die Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze festgestellt, daß ein von ihm untersuchter *Aspergillus niger* die Fähigkeit besaß, in ausgedehntem Maße Oxalsäure zu erzeugen. Eine „Entartung" trat bei der Fortzucht innerhalb zweier Jahre nicht ein. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen unterbrochen und starben ab. Zu neuen Versuchen frisch isoliertes Material erwies sich unfähig, Oxalsäure zu produzieren. Der Autor schreibt weiterhin: „Es früge sich nun, ob es nicht gelingt, durch irgendwelche Eingriffe ein lebhaftes Säuerungsvermögen herzustellen, gleichsam eine stark säuernde Form zu erziehen." Dasselbe Unvermögen, Oxalsäure zu produzieren, stellte Wehmer auch an einem zuerst von Schramm beschriebenen *Aspergillus* fest (1919). Ob inzwischen eine Regenerierung des Oxalsäurebildungsvermögens erzielt wurde, läßt sich aus der zur Verfügung stehenden Literatur nicht entnehmen. Wehmer beobachtete außerdem auch an einem anderen *Aspergillus*, *A. fumaricus*, im Verlaufe von etwa 10 Jahren einen ähnlichen Vorgang. Dieser Pilz, der ursprünglich Fumarsäure produzierte, verlor allmählich dieses Vermögen, um dafür zur Glukonsäurebildung überzugehen. Der Autor meint, diese Erscheinungen unter den Begriff Abschwächung (Degeneration) einreihen zu müssen, wie sie zumal an Bakterien bei lange andauernder Weiterzucht oder unter Einfluß schädigender Faktoren auftreten, wobei die Schwächung in diesem Falle nicht vorübergehend, sondern erblich geworden ist.

Kominami (1910) bemerkte bei Gewöhnungsversuchen mit Aspergillaceen, daß eine Anpassung an Kochsalzlösungen bei seinen Pilzen erfolgte, die durch mehrere Generationen zu beobachten war.

Sie deshalb aber als konstant zu bezeichnen, dürfte bei der verhältnismäßig geringen Anzahl von Generationen nicht angebracht sein. Eingehende Versuche, die sich mit dem Problem der Veränderungen von Aspergillaceen befaßten, stellte E. Schiemann (1912) an. Ihr gelang es, aus dem benutzten, ursprünglich aus einer Spore isolierten Material durch chemische Agentien vom Ausgangsmaterial in Form und Farbe abweichende Arten zu erhalten. Diese erwiesen sich als durchaus konstant und sind nach Jollos (1921) wohl als echte Mutanten anzusehen. H. J. Watermann (1913) bekam durch Zusatz entwicklungshemmender Stoffe gleichfalls Abänderungen und glaubt in der Größe des plastischen Äquivalentes des Kohlenstoffes ein einfaches, festes Merkmal zur Beurteilung seiner „Mutationen" gefunden zu haben, da die Glukose ein Stoff sei, unter deren Einfluß keine Mutation einträte. Auf diese Arbeit wird später noch näher einzugehen sein. Im folgenden Jahr erschien eine längere Arbeit von W. Brenner (1914) über die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. Was an dieser Veröffentlichung hier interessiert, ist die Tatsache, daß dieser Autor im Verlauf seiner Untersuchungen die unangenehme Entdeckung machen mußte, daß ein neu zur Untersuchung herangezogener *Aspergillus niger* (β) von den bislang gefundenen Resultaten vollständig abweichende Ergebnisse lieferte. Die ursprünglichen Kulturen (γ) waren in der Zwischenzeit eingegangen. Nun gelang es zwar, aus Schwesterkulturen des ursprünglich verwendeten *Aspergillus* mit Hilfe von Plattenkulturen noch einige Sporen zu erneutem Wachstum zu bringen. Diese neuen Kulturen (α) wichen aber von den ursprünglichen ebenfalls stark ab. Um seine Arbeit fortsetzen zu können, versuchte der Autor, die Rasse γ wieder zu erhalten; dies gelang ihm auch anscheinend. Im Verlauf von etwa neun Monaten stellte sich auf einer Reinkultur von α, die auf Brot weiter gezüchtet worden war, eine in allem wesentlichen mit der gesuchten Rasse γ übereinstimmende Art ein. Das geschah bei einer Temperatur von 35° C, der Temperatur, bei der auch die ursprüngliche Art γ erhalten worden war. Die Kultur α dagegen stammte aus Gefäßen, die bei Zimmertemperatur gestanden hatten. Diese drei Aspergilli zeigten sich auch hinsichtlich ihres physiologischen Verhaltens teilweise recht verschieden, worüber genaue Daten vorliegen.

Eine besonders auffallende Abänderung eines *Aspergillus* teilte um dieselbe Zeit (1914) R. Schramm mit. Dieser Pilz, bei dem

Wehmer (s. o.) späterhin im Gegensatz zu der sonst bei Aspergillaceen üblichen Oxalsäurebildung das Fehlen dieser Säure nachweisen konnte, war seit 18 Jahren in Kultur. Während dieser Zeit trat allmählich eine starke Veränderung ein; der ehemals normale Pilz fing an, einen schmierigen Überzug zu bilden und stellte die Ausbildung von Konidienträgern vollständig ein. Eine Zurückführung in die Normalform gelang weder Schramm noch Wehmer, der zugleich darauf hinwies, daß es sich eventuell auch um eine zufällige Verunreinigung der Kultur handeln könne, die im Verlauf der Jahre allmählich die Oberhand über die Ursprungsform erlangt hätte. Jedenfalls konnte ein Beweis bis jetzt weder für das eine noch das andere geliefert werden, da sich der Pilz nur noch rein vegetativ verhält.

A. Haenicke (1916) arbeitete über konstante und inkonstante, experimentell hervorgerufene Abänderungen bei *Penicillium glaucum*, *P. luteum* und *Aspergillus niger*. Diese Arbeit und ihre Ergebnisse verdienen besonders erwähnt zu werden. Auf ihre Resultate, die in der Vererbungswissenschaft bei höheren Pflanzen festgelegten Begriffe anzuwenden, wie dies z. B. E. Schiemann ohne weiteres getan hat, hält die Autorin nicht für gerechtfertigt. Sie spricht dagegen die Meinung aus, daß die derzeitigen Ansichten über die Entstehung von Abänderungen bei Mikroorganismen einer Revision oder Ergänzung bedürfen, ohne aber selbst in die Erörterung einer neuen Theorie einzutreten.

F. Chodat (1926) teilte eine Beobachtung an *Aspergillus ochraceus* Wilh. mit. Diese Kultur zeigte einen veränderten Sektor, dessen Nachkommenschaft als γ bezeichnet wurde. Die Unterschiede zwischen diesem und der ursprünglichen Form α haben sich trotz Passagen auf verschiedenen Substraten und Auslese durch Keimsporen mehr als vierzig Generationen erhalten. Dabei spaltete die Rasse γ unter bestimmten Bedingungen die Rasse α ab. Der Autor meint, es handle sich hierbei um einen rückfälligen Dimorphismus, dessen jäher Übergang bis jetzt nur im Sinne $\gamma \rightarrow \alpha$ erhalten werden konnte.

Blochwitz hatte — abgesehen von heliotropen Riesenformen (1914) bei *Aspergillus clavatus* — auch bei anderen Aspergillaceen Veränderung während der Kultur bemerken können, so (1923) z. B. an einem grünen Stamm von *Aspergillus versicolor* das Auftreten rein blauer Kolonien. Mit den übrigen Kolonien bestand sonst vollständige morphologische und physiologische Übereinstimmung.

Die blaue Farbe wurde mehr als vierzig Generationen unter den verschiedensten Lebensbedingungen und bei zahlreichen physiologischen Versuchen unverändert beibehalten. Dann gelang es Blochwitz (1924), einen *Aspergillus* mit verzweigten Konidienträgern zu züchten (*Aspergillus flavus*). Auf Grund seiner Beobachtungen hat der Autor einige Vererbungsgesetze bei Schimmelpilzen aufgestellt. So wird als ein Grundgesetz festgestellt, *Aspergillus*-Konidien können, kurz bevor sie ihre Keimfähigkeit einbüßen, die Fähigkeit verlieren, gewisse Farbstoffe auszubilden (1923). In einer weiteren Veröffentlichung (1925) heißt es: Die Coremienbildung bietet somit ein weiteres Beispiel für das Vererbungsgesetz bei Konidienvermehrung; Schimmelpilze, welche durch viele Generationen unter bestimmten, gleichbleibenden Bedingungen gelebt und unter deren Einfluß bestimmte Eigentümlichkeiten angenommen haben, behalten diese Eigentümlichkeiten auch dann erblich bei, wenn sie unter anderen, normalen, Bedingungen leben oder kultiviert werden, können sie dann aber im Laufe vieler Generationen mehr oder weniger vollständig verlieren. An Hand der oben wiedergegebenen Beobachtungen Vererbungsgesetze aufzustellen und, wie weiterhin geschieht, von erblicher Fixierung erworbener Eigenschaften zu sprechen, dürfte doch nicht ganz am Platze sein; denn schon die Einschränkung, daß wieder ein Verlust der erworbenen Eigenschaften eintreten kann, deutet die Möglichkeit von Dauermodifikationen an, wie solche z. B. von Jollos an Paramaecien festgestellt worden sind.

1. Eigene Versuche.

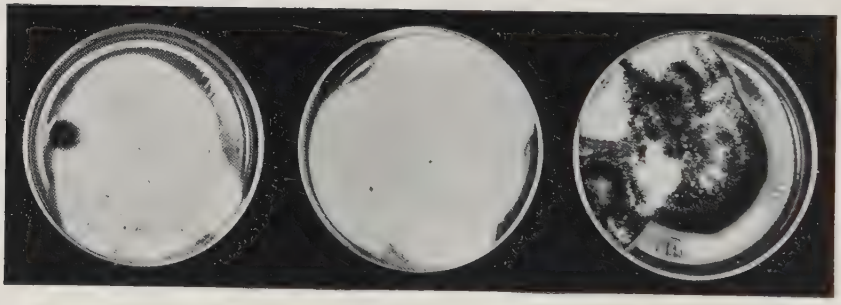
Nach Ausführungen von Blochwitz (1928) wäre es denkbar, daß die von uns erhaltenen, schwach sporulierenden Myzelien Krankheitserscheinungen sind. Diese müßten sich nach seiner Vorstellung bei fortgesetzter Überimpfung auf natürlichen Nährböden rückgängig machen lassen. Versuche in dieser Richtung wurden in der Folge mit allen sechs Stämmen von *Aspergillus niger* Tübingen unternommen. Jeder Stamm wurde acht Generationen hindurch auf Kartoffelstückchen gezüchtet. Auf die Bereitung dieser Kulturen sei kurz eingegangen. Die Form der Kulturröhrchen und die Herstellung der Kartoffelstückchen ist bei Kolkwitz (1914) zu ersehen. Die rohen Kartoffelstückchen wurden mit einer Pinzette in die vorher sterilisierten Versuchsröhrchen eingeführt, die Wandung dieser Reagenzgläser mit redestilliertem

Wasser abgespritzt, um sie zu säubern und auch um in der Folge ein vorzeitiges Austrocknen der Kartoffelstückchen möglichst zu verhindern. Es erübrigt, darauf hinzuweisen, daß Bohrer und Messer vor jedem Gebrauch mit destilliertem Wasser abgespült, in Alkohol getaucht und damit abgebrannt wurden. Bei dieser aseptischen Behandlung genügt einmalige, viertelstündige Sterilisierung in strömendem Wasserdampf. Von den übrig gebliebenen etwa dreißig Kulturröhrchen zeigte keines, selbst nach dreivierteljährigem Stehen, irgendeine Infizierung. In diesem Zeitpunkt war naturgemäß das Substrat stark eingetrocknet, wurde aber von darauf geimpften Pilzen genau so gut angenommen wie die Kartoffeln der frischen Röhrchen.

Auf die so hergestellten Nährböden wurden nun Konidien der Stämme *1—6* mit einer Platinöse aufgeimpft. Auf allen Kulturen zeigte sich schon am nächsten Tag Wachstum, am zweiten Tag beginnende Sporulation, die sich am vierten über die ganze bewachsene Oberfläche ausgedehnt hatte und überall die intensiv schwarzbraune Farbe des *Aspergillus niger* aufwies. Es fragte sich nun, ob durch diese Veränderung der Kulturbedingung die *Aspergillus-niger*-Stämme *1—6* wieder zu ihrer Ausgangsform, dem ursprünglichen Tübinger *Aspergillus*, und dessen Sporulationsweise zurückgeführt waren. Da nun aber schon die ersten Kulturen auf den Kartoffeln von vornherein ein kräftiges Sporulationsvermögen gezeigt hatten, lag es näher, anzunehmen, daß eine bloß modifizierende Wirkung des Substrates dabei im Spiele war; um dies genauer zu prüfen, wurden die Kulturen jeweils am vierten Tag in ein neues Kartoffelröhrchen übergeimpft. Stets war eine völlig gleichmäßige Sporulation aller 6 Stämme zu sehen. Weiter wurden sämtliche Impfgenerationen der 6 Stämme am gleichen Tage auf Agarplatten von derselben Zusammensetzung geimpft, wie sie für die Kulturröhrchen verwendet wurde. Sowohl Kartoffelkulturen, als auch die Agarkulturen standen bei einer Temperatur von 30—32°. Nach vierzehntägigem Wachstum der Agarkulturen wurden sämtliche Platten photographiert. Die Abbildung der ersten (Fig. 3) und der achten Generation (Fig. 4) zeigt nun mit Deutlichkeit, daß durch die veränderte Kultur keineswegs eine Rückkehr zu dem ursprünglichen Zustand erfolgt ist; die erste und die achte Generation gleichen sich vielmehr auf Agar noch vollkommen. Der Einfluß der Kartoffelkultur ist also als rein modifizierend aufzufassen.

Bemerkenswert ist, daß der auch auf Biomalzagar gut sporulierende Einsporkulturstamm *6* die Neigung hat, in Sektoren von stark sporulierendem und kaum sporulierendem Myzel zu zerfallen, wie Fig. 5 zeigt. Dieser Vorgang ließ sich nicht nur einmal, sondern in mehr oder minder starkem Maße insgesamt dreimal bei den rückgeimpften Kulturen feststellen. Stamm 6 wirdalso der ur-

Stamm *1* *2* *3*



Stamm *4* *5* *6*

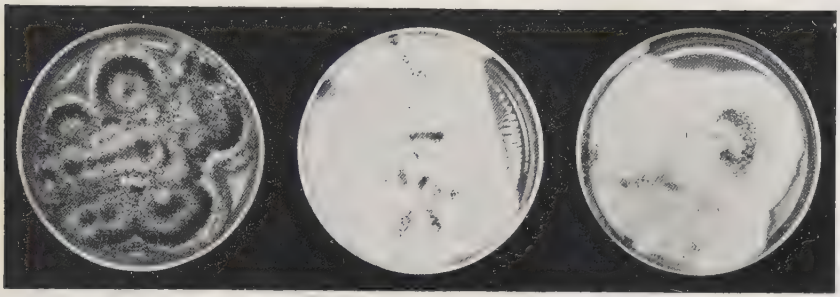
Fig. 3.

Aspergillus niger (Tübingen). Stamm *1—6* auf Biomalzagar.

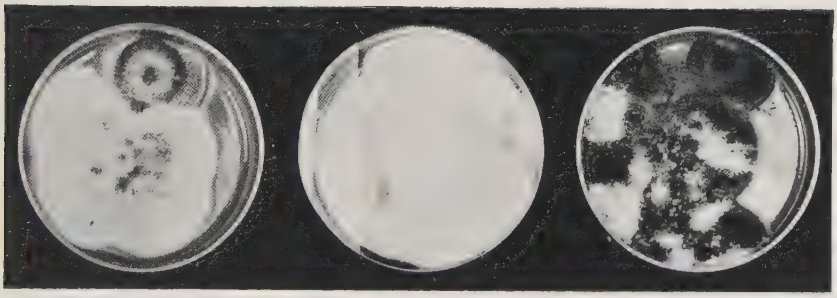
sprünglichen Form des *Aspergillus niger* Tübingen wohl am nächsten stehen, da er noch das Aufspaltungsvermögen besitzt, das auch der Ausgangsform zu eigen gewesen sein muß.

Nunmehr sei auf die schon oben erwähnten Ausführungen Watermans (1913) näher eingegangen. Waterman schreibt (S. 3): „An anderer Stelle habe ich schon mehrere Ursachen der Mutation bei *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger* beschrieben.

Die Anzahl derselben hat sich seither aber stark vermehrt und jetzt ist mir der Grund der Wirkung aller dieser Mutation verursachender Umstände bekannt", ferner S. 5: „Bei *Aspergillus niger*



Stamm *1* *2* *3*



Stamm *4* *5* *6*

Fig. 4. *Aspergillus niger* (Tübingen). Stamm *1—6* auf Biomalzagar nach 8-maliger Kartoffelpassage.

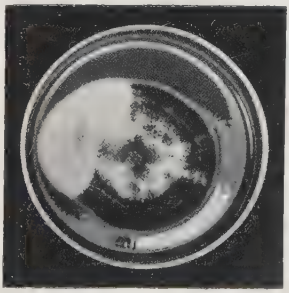


Fig. 5. *Aspergillus niger* (Tübingen). Stamm *6* Sektorenbildung auf Biomalzagar.

ist der Grund der Wirkung von allen diesen, Mutation veranlassenden Faktoren wiederum derselbe wie bei *Penicillium glaucum*. Alle hemmen die Entwicklung von *Aspergillus* in hohem Grade;

Borsäure und Kupfersulfat üben in geringer Konzentration wohl eine hemmende Wirkung auf *Aspergillus niger* aus, doch wird keine Mutation verursacht; in sehr hoher Konzentration dieser Gifte, wenn die Entwicklung nur nach geraumer Zeit nach der Impfung anfängt, tritt Mutation auf". Auch Galaktose wird im Gegensatz zu Glukose als ein Faktor angesehen, der bei *Aspergillus niger* Mutation veranlaßt. S. 6: „In Tafel I sieht man deutlich die stattgefundene Mutation in Kulturen auf 2% Galaktose. Neben der ursprünglichen Form mit schwarzen Sporen sind in diesen Kulturgefäßen noch eine braune und eine weiße Form zu beobachten. Zum Vergleich sieht man dieselbe Stammform, mit welcher diese Kulturen geimpft waren, auf einer 2proz. Glukosenährlösung von übrigens derselben Zusammensetzung unter gleichen Umständen kultiviert. Das normale, schwarze Aussehen dieser Kultur ist besonders verschieden von der Galaktosepilzdecke." S. 7: „Alle erhaltenen Mutanten bleiben beim Kultivieren auf normalen Kulturmedien (z. B. Malzagar) konstant." S. 12: „Man sieht also, daß man in der Größe des plastischen Äquivalentes des Kohlenstoffs ein einfaches, festes Merkmal zur Beurteilung der Mutation findet." Dagegen heißt es zwei Sätze vorher: „Besonders merkwürdig ist es, daß das plastische Äquivalent des Kohlenstoffs der beiden farbigen Mutanten von Fräulein E. Schiemann auch nur sehr wenig von demjenigen der zugehörigen Stammform verschieden ist." — Damit ergibt sich, daß das plastische Äquivalent (d. h. die Prozentzahl des gebotenen Kohlenstoffs, der in einer bestimmten Zeit zur Substanzbildung des Myzels dient) kein festes Merkmal zur Beurteilung einer Mutation sein kann. Doch läßt es sich immerhin als ein einfaches, aber nicht ausschließliches Hilfsmittel benutzen, um die Veränderung physiologischer Eigenschaften festzustellen.

Diese Ausführungen scheinen unter dem Eindruck der um jene Zeit veröffentlichten Schiemannschen Arbeit (1912) entstanden zu sein. Schiemann (S. 30) nahm an, daß die Mutabilität durch starken Reiz außerordentlich gefördert wird, ein Resultat, das Haenicke (S. 227) nicht anerkennt. Waterman (1913) wollte nun noch einen Schritt weiter gehen, indem er die Ursachen der von Frl. Schiemann konstatierten Veränderungen festzustellen suchte.

Unsere Ergebnisse decken sich durchaus mit den seinigen. Waterman fand einmal, daß eine bestimmte Ausgangsform unter

bestimmten äußeren Bedingungen Veränderungen hervorbringt und daß diese veränderten Stämme bei Weiterkultur auf Agar konstant bleiben. Wir möchten in diesem Zusammenhange hier die Auffassung vertreten, daß diese äußeren Bedingungen, bei denen zuerst das Auftreten neuer Formen festgestellt wurde, jedenfalls nicht als die Ursachen der Veränderungen aufzufassen sind. Vielmehr ließe sich auch gut annehmen, daß den verschiedenen Rassen des *Aspergillus niger* von vornherein ein ganz verschiedenes Vermögen in der Abspaltung von neuen Rassen (mag man sie nun Mutationen oder irgendwie anders nennen) zukommt, und daß bestimmte Außeneigenschaften nicht unter allen, sondern nur unter jeweils besonderen Bedingungen manifest werden. Daß die erste unserer Annahmen zutrifft, zeigt ein Vergleich des Stammes *6* mit den anderen. Hier werden stets von neuem innerhalb verhältnismäßig weniger Zellgenerationen nicht oder wenig sporulierende Stämme abgespalten, wie die Sektorenbildung deutlich zeigt, während die anderen zwar auch einmal auf ähnliche Weise entstandenen neuen Formen nur in sehr viel größeren Generationszusammenhängen auftraten. Dieses besondere Spaltungsvermögen des Stammes *6* zeigt sich jedoch nur, solange er auf Agar wächst; bringt man ihn auf Kartoffeln, so verschwindet diese Differenz zwischen ihm und unseren anderen Stämmen vollständig.

Im Verlauf unserer Versuche konnte beobachtet werden, daß nicht nur auf Kartoffeln, sondern auch auf künstlichem Nährboden das Sporulationsvermögen des auf Agar fast rein weißen Stammes *5* unter bestimmten Bedingungen an das des gut sporulierenden Stammes *6* heranreichte, soweit sich das überhaupt durch Abschätzen feststellen läßt. Die Eigenschaft, auf Agar schwach zu sporulieren, büßte aber Stamm *5* niemals ein. Ein Abschnitt der Versuchsprotokolle, die über alle Kulturen angelegt wurden und sich auf Keimung, Gesamthabitus, Myzeldecken oder Inselbildung, Sporulation und anderes bezogen, gibt bei Versuchsreihe C (Stickstoffquelle: Kaliumnitrat; Salzsäurezusatz) folgendes Bild:

Sporulation nach 10 Tagen.

2 mg N.	Stamm *5*.	Stamm *6*.
	Zusammenhängende Myzeldecke Nr. 2 und Nr. 3. Nicht vollständig ausgebildete Myzeldecke Nr. 1, Nr. 4, Nr. 5. Kleine Myzelinsel Nr. 6. Wenig submerses Myzel Nr. 8. In Nr. 9 vier minimale Flöckchen. Sporulation wesentlich geringer als bei Stamm *6*.	Sporulierende Myzeldecke Nr. 1—5. Kleine sporulierende Myzelinsel Nr. 6. Das Übrige noch in der Flüssigkeit. Keimung bis Nr. 8.

10 mg N.	
Analog 2 mg N. Vollständig ausgebildete Myzeldecke Nr. 1—5. Sporulationsintensität so stark wie bei Stamm *6*.	Nr. 6 minimal stärkere Decke als bei 2 mg N. Die Sporulation ist durchweg intensiver als bei 2 mg.
50 mg N.	
Zusammenhängende Myzeldecke Nr. 1—5. Nr. 6—8 noch submers. Keimung bis Nr. 8 einschließlich. Sporulationsintensität wie bei Stamm *6*.	Stark sporulierende Myzeldecke Nr. 1—5. Nr. 6 nur submerse Myzelflöckchen. Sporulationsintensität Nr. 1—4 etwa wie bei 10 mg N, Nr. 5 wesentlich geringer. Keimung bis Nr. 6 einschließlich.

Bemerkung: Mit 10 und 50 mg N ist bei starker Sporulation ein Unterschied zwischen Stamm *5* und Stamm *6* nur am Habitus der Konidienträger zu erkennen.

Da die Parallelversuche zwischen Stamm *5* und Stamm *6* jeweils am gleichen Tage angesetzt wurden, ergibt sich aus den Tabellen, da direkte Vergleichswerte vorliegen, ein einigermaßen richtiges Bild im Gegensatz zu der nur sehr relative Werte liefernden Abschätzungsmethode (schwach, mittel, stark usw. sporulierend). Letztere Methode ließ sich bei der Protokollaufnahme in Experimenten mit nur einem Stamm nicht vermeiden, zumal Versuche, die Sporulationsintensität zählenmäßig zu erfassen, scheiterten. (Die zu analysierenden Myzelien wurden dabei eine bestimmte Zeit bei konstanter Tourenzahl auf der Schüttelmaschine geschüttelt, die Sporenmenge in der Zählkammer festgestellt und auf das Myzelgewicht bezogen. Die erhaltenen Werte lagen außerhalb verwendbarer Resultate.) Erwähnt sei noch, daß die Sporulationsstärke von Stamm *5* bei den Versuchen mit Kaliumnitrat und Oxalsäure nicht an diejenige von Stamm *6* heranreichte, obwohl auch hier bei beiden Stämmen starke Sporulation auftrat.

Ferner sei erwähnt, daß auch *Aspergillus niger* Tübingen die Eigenschaft hat, unter bestimmten Bedingungen eine braune Form zu bilden, und zwar konnte dies sowohl bei dem dazu benutzten Stamm *5* als auch bei Stamm *6* beobachtet werden. Biomalzagarröhrchen wurden nach der Beimpfung im März 1930 ins Freie gestellt. Als Ergebnis zeigte sich bei beiden Stämmen, daß die schwach ausgebildete Myzeldecke außerordentlich niedrig blieb und nur zimmtbraune Konidien hervorbrachte: Diese waren bei der Rückimpfung mit der Platinnadel sowohl auf Biomalzagar als auf Kartoffeln inkonstant, d. h. schon die erste Generation unter normalen Laboratoriumsbedingungen zeigte das gewöhnliche Aussehen.

Fassen wir nun unsere im Laufe dieser Versuche gewonnenen Erfahrungen über die Rassenbildung bei *Aspergillus niger* zusammen,

so scheint es sich dabei um ein ganz besonders komplexes Phänomen zu handeln, dessen einzelne Komponenten infolge des Fehlens der sexuellen Fortpflanzung nicht immer analysierbar sind. Greifen wir zunächst das Sporulationsvermögen als hier am eingehendsten analysierte Eigenschaft heraus, so ist klar, daß es sich dabei um eine weitgehend durch äußere Bedingungen modifizierbare Eigenschaft handelt. Die tatsächlich in einem Versuch von einer Pilzkultur gebildete Sporenmenge ist einmal abhängig von Ernährung, Temperatur und Alter der Kultur, andererseits aber auch von einem bestimmten und vermutlich erblichen Sporulationsvermögen. Dieses Sporulationsvermögen kann sich, wie das offenbar bei der Tübinger Ursprungsrasse und dem daraus neu isolierten Stamm *6* der Fall ist, spontan ändern und neue Rassen mit verändertem Reaktionsverhalten abspalten. Dafür, daß diese Spaltungen unter Umständen sehr häufig vor sich gehen können, ist die Ausbildung schlecht sporulierender, nahezu weißer Sektoren auf den Agarkulturen der beste Beweis. Daß diese Abspaltung bezw. das Abspaltungsvermögen etwa eine vom Substrat induzierte Modifikation (eine Dauermodifikation im Sinne von Jollos) ist, scheint deshalb wenig wahrscheinlich, weil sie nur den Tübinger Stamm betrifft, nicht aber alle anderen ebenso lange auf dem gleichen Substrat und im gleichen Institut kultivierten Stämme: *A. niger* var. *altipes*, *A. niger* Göttingen usw.[1]) So ist zwar anzunehmen, daß hier der gleiche Unterschied vorliegt, wie wir ihn bei höheren Pflanzen zwischen häufig und selten mutierenden Charakteren vorfinden; trotzdem ist es korrekter, nicht von Mutationen zu reden, weil sie aus den bekannten Gründen nicht mit echten Mutationen vergleichbar sind. Die spontane Abspaltung andersartiger Rassen ist im übrigen bei unserem Material nicht nur auf dieses Merkmal der Formbildung beschränkt, auch Eigenschaften des Stoffwechsels werden davon betroffen; sahen wir doch, daß bei den Vorversuchen sich Stamm *5* von Stamm *6* durch sein Vermögen, Zitronensäure zu bilden, unterscheidet. Die anderen Unterschiede gehen aus den Ergebnissen von Abschnitt III dieser Arbeit hervor.

Daß es daneben Änderungen gibt, die sich auf den Einfluß des Substrates zurückführen lassen und bei Konidienvermehrung höchstwahrscheinlich auch über eine Reihe von Generationen weitergegeben werden, läßt sich gleichfalls an unserem Material verdeut-

1) Offenbar liegen bei dem von Waterman verwendeten Material ganz ähnliche Verhältnisse vor wie bei dem von uns untersuchten *Aspergillus niger* Tübingen.

lichen. Sowohl der Tübinger Stamm als auch die parallel kultivierten Stämme haben im Laufe der Zeit ganz gleichmäßig wohl definierte Eigenschaften verloren; sie sind nahezu unfähig geworden den Stickstoff der Luft zu binden und haben fast völlig das Vermögen verloren, Zitronensäure zu bilden.

Halten wir es nach unseren Erfahrungen auch für wenig wahrscheinlich, daß die spontane Veränderlichkeit durch das Substrat beeinflußt und somit experimentell erfaßt werden kann, so sind jedenfalls die letztgenannten Modifikationen (Dauermodifikationen?) im Versuch faßbar und, wenn ihre Analyse auch ein sehr umständliches und schwieriges Verfahren ist, so wird sich doch von dort aus das ungemein wichtige Problem der Rassenbildung bei den physiologisch interessanten Pilzen fördern lassen.

2. Zusammenfassung der Ergebnisse von Abschnitt IV.

1. Bei Erneuerung der Einsporkulturen vom *Aspergillus cinnamomeus montanus*, *A. niger* Göttingen und *A. niger* Tübingen erwiesen sich lediglich die ersten beiden konstant; von *A. niger* Tübingen erhielten wir dabei äußerlich verschiedene Stämme. Unter diesen befand sich aber keiner, der dem von Schober beschriebenen Ursprungstypus glich; morphologisch sowie physiologisch bestanden Differenzen, die bisher auch experimentell nicht wieder ausgeglichen werden konnten.

2. Von den sechs neugewonnenen Stämmen des *A. niger* Tübingen verhielten sich fünf in ihren Eigenschaften wesentlich konstanter als Stamm *6*, der ständig neue Stämme abspaltet.

3. Das verschieden starke Sporulationsvermögen unserer Stämme führt nur unter bestimmten äußeren Bedingungen zur Ausbildung differenter Sporenmassen; unter anderen können die Unterschiede völlig verdeckt werden.

4. Diese verschiedenartige Reaktionsweise auf die äußeren Bedingungen erklärt unserer Ansicht nach auch die von Waterman anscheinend erreichten Mutationsauslösungen. Der von ihm verwendete *Aspergillus*-Stamm zeigt auch in seinem Spaltungsvermögen weitgehende Ähnlichkeit mit unserem Stamm *6*.

Literatur.

Benecke-Jost, Pflanzenphysiologie, 1923.

Bernhauer, K., Über die Charakterisierung der Stämme von *Aspergillus niger*, zweite Mitteilung. Biochemische Zeitschr., Bd. 205, 1929.

Blochwitz, A., Eine allgemeine Ursache spontaner Verlustmutationen bei Schimmelpilzen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 41, 1923.

— —, Entstehung von *Aspergillus*-Varietäten mit verzweigten Konidienträgern. Ebenda, Bd. 43, 1925.

— —, Hygiene der Schimmelpilze. Ebenda, Bd. 46, 1928.

Bertrand, G., Chem. Zentralbl., 1907, I.

Boesecken und Waterman, Über die Wirkung der Borsäure und einiger anderer Verbindungen auf die Entwicklung von *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*. Fol. Mikrobiol. Holl. Beitr. z. ges. Mikrobiologie, 1912, Nr. 1.

Brenner, W., Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. Zentralbl. f. Bakt.- u. Parasitenkunde, II. Abt., Bd. 40, 1914.

Chodat, F., Recherches experimentales sur la mutation chez les champignons. Extr. du Bull. Soc. Bot. de Genève, Sér. II, 1926.

Clark, On the toxic effect of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. Bot. Gaz., Vol. 28, 1899.

Currie, James N., The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. Journal of Biological Chemistry, Vol. 31, 1917.

Czapek, F., Biochemie der Pflanzen, III. Aufl., 1922.

Duggar, B. M., Physiological studies with reference to the germination of certain fungus spores. Bot. Gaz., Vol. 31, 1901.

Effront, Sur le mécanisme de l'acclimation des microorganismes aux substances toxiques. Compt. rend. soc. biol. Paris, T. 83, 1920.

Eisenberg, Untersuchungen über die Variabilität der Bakterien. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 63, 66, 73 (1912/14).

— —, Über Mutationen bei Bakterien und anderen Mikroorganismen. Ergebnisse der Immunitätsforschung, Bd. I.

Emich, F., Lehrbuch der Mikrochemie, 1926.

Fitting, Untersuchungen über Chemodinese bei *Vallisneria*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 67, 1928.

Haenicke, A., Vererbungsphysiologische Untersuchungen an Arten von *Penicillium* und *Aspergillus*. Zeitschr. f. Bot., Bd. 8, 1916.

Jollos, V., Variabilität und Vererbung bei Mikroorganismen. Zeitschr. f. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre, Bd. 12, 1914.

— —, Untersuchungen über Variabilität und Vererbung bei Infusorien. Archiv f. Protistenkunde, Bd. 43, 1921.

Karrer, P., Lehrbuch der organischen Chemie, 1928.

Kiesel, Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. Compt. rend. acad. sciences Paris, T. 155, 1912.

Klein, J., Über die sogenannte Mutation und die Veränderlichkeit des Gärvermögens bei Bakterien. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 73, 1912.

Klöcker, A., Arbeitsmethoden zur Züchtung von Hefen und Schimmelpilzen. Handb. d. mikrobiol. Technik, Bd. III, 7. Abt., 1924.

Kolthoff, J. M., De beteekenis van p_H vor de bakteriologie. Tijdschr. ver geneesk., Bd. 11, 1925.

Kominami, K., Biologisch-physiologische Untersuchungen über Schimmelpilze. Journ. of the Coll. sciences imp. univ. of Tokyo, Bd. 27, 1909.

Küster, E., Kultur der Mikroorganismen.

Lehmann, E., Bakterienmutation. Allogonie. Klonumbildung. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 77, 1916.

Lindner, siehe Klöcker.

Michaelis, L., Die Wasserstoffionenkonzentration, 1924.

Misslowitzer, E., Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration von Flüssigkeiten, 1928.

Nikitinsky, J., Über die Beeinflussung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 40, 1904.

Parnas und Wagner, Über die Ausführung von Bestimmungen kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl. Biochem. Zeitschr., Bd. 125, 1921.

Pregl, O. M., Die quantitative organische Mikroanalyse, 1923.

Pringsheim, E. G., Methoden und Erfahrungen. Zeitschr. f. Bot., Bd. 6, 1914.

— —, Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen, 5. Mitteilung. Beitr. z. Biologie d. Pflanzen, Bd. XIV, Heft 3, 1926.

Reichel, J., Über das Verhalten von *Penicillium* gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen. Biochem. Zeitschr., Bd. 30, 1910.

Schiemann, E., Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem. Zeitschr. f. indukt. Abstammungs- u. Vererbungslehre, Bd. 8, 1912.

Schnegg, H., Das mikroskopische Praktikum des Brauers, Bd. 2, 1922.

Schober, R., Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 72, 1930.

Schramm, R., Über eine bemerkenswerte Degenerationsform von *Aspergillus niger*. Mykolog. Centralbl., Bd. 5, 1914.

Stahel, G., Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 49, 1911.

Stevens, The effect of aquous solutions upon the germination of fungus spores. Bot. Gaz., Vol. 26, 1898.

Suto, K., Ein Beitrag zur Mikromethode der Stickstoffbestimmung nach I. Bang. Biochem. Zeitschr., Bd. 187, 1927.

Traube, Nochmals die Wasserstoffionen. Biochem. Zeitschr., Bd. 120, 1921.

Waterman, H. J., Über die Wirkung von Wasserstoffionen, Borsäure, Kupfer, Mangan, Zink und Rubidium auf den Stoffwechsel des *Aspergillus niger*. Referat aus Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, II. Abt., Bd. 43, 1915.

— —, Mutationen bei *Penicillium glaucum* und *Aspergillus niger*. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 3, 1913.

Webb, Robert W., Studies in the physiology of the fungi. XV. Germination of the spores of certain fungi in relation to hydrogen-ion concentration. Ann. Missouri Bot. Garden, Vol. 8, 1921.

Wehmer, C., Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Zeitung, Bd. 49, 1891.

— —, Kleinere mykologische Mitteilungen. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, II. Abt., Bd. 3, 1897.

— —, Zur Kenntnis einiger *Aspergillus*-Arten. Ebenda, Bd. 18, 1907.

— —, Verlust des Oxalsäurebildungsvermögens bei einem degenerierten *Aspergillus niger*. Ebenda, Bd. 49, 1919.

— —, Abnahme des Säurebildungsvermögens und Änderung der Säure bei einem Pilz. Glukonsäure — statt Fumarsäuregärung. Biochem. Zeitschr., Bd. 197, 1928.

Lebenslauf.

Am 2. Mai 1905 wurde ich, Ekkehard Kadelbach, als Sohn des Apothekers Johannes Kadelbach und seiner Ehefrau Marianne, geb. Stenzel, zu Petersdorf im Riesengebirge, Kreis Hirschberg, geboren. Vom Jahre 1911 an besuchte ich in Ludwigsburg Wttbg., wohin mein Vater im gleichen Jahre übergesiedelt war, die Vorschule und das Gymnasium bis einschließlich Untersekunda, um anschließend die drei Oberklassen an der dortigen Oberrealschule zu absolvieren. Diese Anstalt verließ ich im Jahre 1923 nach erfolgter Reifeprüfung. Ich ergriff den Apothekerberuf, verbrachte meine Praktikantenzeit in Stuttgart, die Assistentenzeit in Karlsruhe und bezog im Jahre 1926 im Sommersemester die Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, wo ich im Mai 1928 das Staatsexamen bestand. Anschließend daran belegte ich ein Jahr lang das große Botanische Praktikum und nahm an den physiologischen und physikalischen Übungen teil. Hierauf siedelte ich an die Technische Hochschule zu Darmstadt über, um bei Herrn Prof. Dr. Oehlkers mit der Ausführung meiner Doktorarbeit zu beginnen, die ich im Dezember 1930 zum Abschluß bringen konnte. Im Jahre 1930 wurde mir auf Grund meiner Tätigkeit die staatliche Approbation als Apotheker zuerkannt.

Meine akademischen Lehrer waren:
Gerlach Heil Kliegl Knoop Lehmann Meisenheimer Müller Oehlkers Schwemmle Wolff Zimmermann.